

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年6月17日 (17.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/051281 A1

(51) 国際特許分類7: G01N 33/68, 27/447, 27/62

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015270

(22) 国際出願日: 2003年11月28日 (28.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-347777
2002年11月29日 (29.11.2002) JP

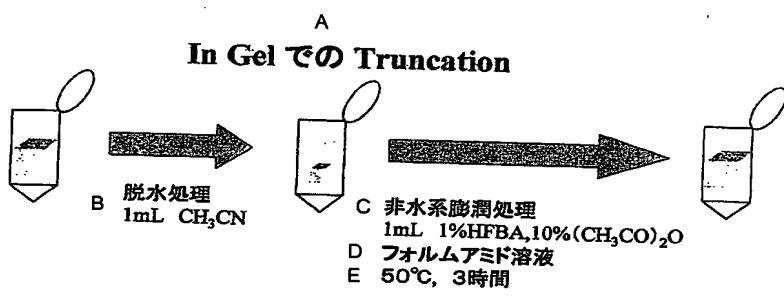
(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 日本電気
株式会社 (NEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒108-8001
東京都 港区 芝五丁目 7 番 1 号 Tokyo (JP). 東京理化器
械株式会社 (TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD.) [JP/JP];
〒103-0023 東京都 中央区 日本橋本町 3 丁目 3 番 4 号
Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 宮崎 賢司
(MIYAZAKI,Kenji) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都 港区
芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP).
次田 晃 (TSUGITA,Akira) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都
港区 芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内 Tokyo
(JP). 上條 憲一 (KAMIJO,Kenichi) [JP/JP]; 〒108-8001
東京都 港区 芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内
Tokyo (JP). 鍋谷 卓司 (NABETANI,Takuji) [JP/JP]; 〒
103-0023 東京都 中央区 日本橋本町 3 丁目 3 番 4 号
東京理化器械株式会社内 Tokyo (JP).

[統葉有]

(54) Title: METHOD OF ANALYZING C-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCE OF PEPTIDE

(54) 発明の名称: ペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法



A...TRUNCATION In Gel
B...DEHYDRATION
1mL CH₃CN
C...SWELLING IN NON-AQUEOUS SYSTEM
1mL 1% HFBA, 10% (CH₃CO)₂O
D...FORMAMIDE SOLUTION
E...50°C, 3 HOURS

(57) Abstract: It is intended to provide a method of analyzing the C-terminal amino acid sequence of a peptide by using reactions of successively degrading the C-terminal amino acids whereby, in successively degrading the C-terminal amino acids of a peptide, undesirable side reactions (for example, cleavage of a peptide bond at the middle of the peptide) can be inhibited and chemical treatments therein can be carried out under commonly usable conditions. Namely, a method which comprises preliminarily separating a target peptide by gel electrophoresis, dehydrating the peptide while holding it on the gel, immersing it in a liquid mixture prepared by adding a small amount of a perfluoroalkanoic acid to an alcanoic acid anhydride in a dipolar aprotic solvent and, after re-swelling the gel support and forming a 5-oxazolone structure within a temperature range of from 30°C to 80°C, specifying the C-terminal amino acid sequence of the peptide based on the decrease in the molecular weight of a series of reaction products obtained by the degradation of the C-terminal amino acids accompanying the cleavage of the 5-oxazolone ring.

(57) 要約: 本発明は、ペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解する際、ペプチド途中におけるペプチド結合の切断などの好ましくない副次反応を抑制でき、その化学的な処理を汎用性の富む条件で実施することが可能な、逐次的C末端アミノ酸の分解反応手段を利用したペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法として、予めゲル電気泳動法により分離した対象ペ

WO 2004/051281 A1

[統葉有]



(74) 代理人: 宮崎 昭夫, 外(MIYAZAKI, Teruo et al.); 〒 添付公開書類:
107-0052 東京都港区赤坂1丁目9番20号第16興和ビル8階 Tokyo (JP). — 国際調査報告書

(81) 指定国(国内): AU, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

ブチドを、ゲル上に担持状態のままで、脱水処理を施し、双極性非プロトン性溶媒中、少量のパーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に加えた混合溶液中に浸漬し、30°C~80°Cの範囲の温度で、ゲル担体の再膨潤と、5-オキサゾロン構造を経て、該5-オキサゾロン環の開裂に伴うC末端アミノ酸の分解により得られる一連の反応産物の分子量減少に基づき、C末端アミノ酸配列を特定する方法を提供する。

明細書

ペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法

技術分野

5 本発明は、ペプチドのC末端アミノ酸配列を解析する方法に関し、より具体的には、少なくとも、50アミノ酸以上、通常、100アミノ酸以上のペプチド鎖からなるタンパク質など、ゲル電気泳動法による分離がなされるペプチドに関して、該ゲル担体上に担持された状態のまま、化学的方法により該ペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解して、その反応産物の分子量を質量分析により決定し、
10 逐次的に除去される一連のアミノ酸に起因する分子量減少に基づき、C末端アミノ酸配列を解明する方法に関する。

背景技術

天然より採取されるペプチドやタンパク質に関して、そのアミノ酸配列の同定は、かかるペプチドやタンパク質の生物学的性質、機能を研究する際、不可欠な情報である。現在、ペプチドやタンパク質の全アミノ酸配列は、対応する遺伝子情報、すなわち、これらのペプチドをコードしているゲノム遺伝子やm-RNAより調製されたc-DNAの塩基配列に基づき、推断されるアミノ酸配列として決定されている。その際、該ペプチドをコードしているゲノム遺伝子やm-RNAより調製されたc-DNAを特定する上では、ペプチドの部分的なアミノ酸配列の知見は、依然として必要である。

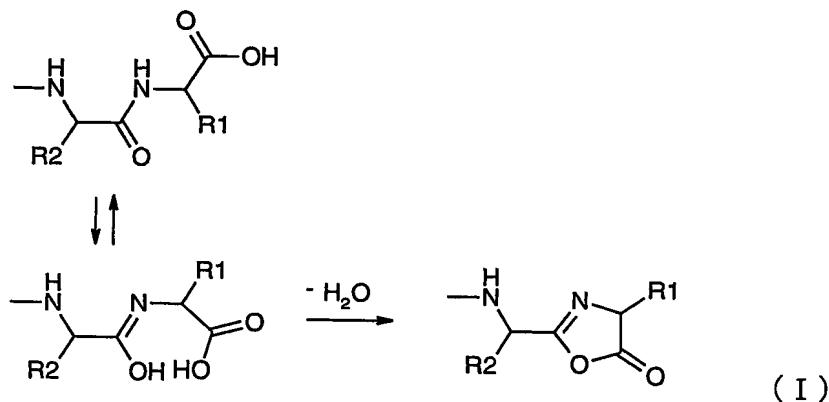
このペプチドの部分的なアミノ酸配列の知見としては、一般に、ペプチドのN末端アミノ酸配列とC末端アミノ酸配列とが、特に有用とされている。具体的には、例えば、多数のm-RNAより調製されたc-DNAライブラリーから、目的とするペプチドをコードしているc-DNAを選別する際、仮に、N末端アミノ酸配列とC末端アミノ酸配列とが判明していると、かかる両末端のアミノ酸配列に基づき、作製された核酸プローブを利用して、目標とするc-DNAを選別

することが可能となる。あるいは、両末端のアミノ酸配列に基づき作製されたオリゴヌクレオチド・プライマーを利用して、PCR法を適用して、目標とするc-DNAを選択的に増幅することも可能となる。

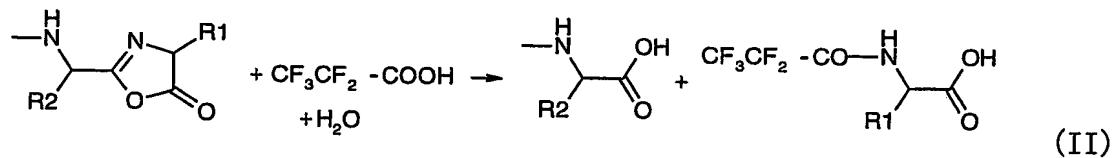
ペプチドのN末端アミノ酸配列を解析する手法としては、従来から、予め単離・精製を行ったペプチド純品に、エドマン分解を適用して、N末端アミノ酸を逐次的に分解しつつ、生成するアミノ酸誘導体を同定する手法が利用されている。一方、ペプチドのC末端アミノ酸配列を解析する手段として、同じくペプチド純品に対して、化学的手法によりC末端アミノ酸を逐次的に分解し、その反応産物として得られる短縮されたペプチドと元のペプチドとの分子量差から、分解されたC末端アミノ酸を特定する方法が既に提案されている。例えば、化学的手法によりC末端アミノ酸を逐次的に分解する手段として、90°Cに加熱しつつ、乾燥したペプチド純品に、ペンタフルオロプロパン酸 (CF_3CF_2COOH) 高濃度水溶液、あるいは、ヘptaフルオロブタン酸 ($CF_3CF_2CF_2COOH$) 高濃度水溶液から発生した蒸気を作用させて、前記パーフルオロアルカン酸により促進される、C末端アミノ酸の選択的な加水分解を行わせる方法が提案されている (Tsugita, A. et al., Eur. J. Biochem. 206, 691-696 (1992))。加えて、前記パーフルオロアルカン酸高濃度水溶液に代えて、無水ペンタフルオロプロパン酸 ($(CF_3CF_2CO)_2O$) のアセトニトリル溶液、無水ヘptaフルオロブタン酸 ($(CF_3CF_2CF_2CO)_2O$) のアセトニトリル溶液を利用し、例えば、-18°Cに冷却しつつ、この溶液から発生した蒸気を乾燥したペプチド純品に作用させて、前記パーフルオロアルカン酸無水物により促進される、C末端アミノ酸の選択的な分解を行わせる方法が提案されている (Tsugita, A. et al., Chem. Lett. 1992, 235-238; Takamoto K. et al., Eur. J. Biochem. 228, 362-372 (1995))。

前記の乾燥したペプチド純品に、気相から蒸気として供給されるパーフルオロアルカン酸、あるいは、パーフルオロアルカン酸無水物を作用させ、C末端アミ

ノ酸の選択的な分解を行う手法では、下記する反応式（I）で表記される脱水反応：



5 により、C末端アミノ酸から反応中間体として、オキサゾロン環構造が一端形成される。次いで、パーフルオロアルカン酸がこのオキサゾロン環に作用し、次に示す反応式（II）で表記される反応：



10 が生じ、結果的に、C末端アミノ酸の選択的な分解反応が達成されると報告されている。

上記のC末端アミノ酸の選択的な分解反応は逐次的に進み、所定の処理時間が経過した時点で、元のペプチドに対して、1～10数アミノ酸残基がそのC末端からそれぞれ除去された一連の反応産物を含む混合物が得られる。この一連の反応産物を含む混合物に対して、質量分析法を適用して、各反応産物に由来するイオノン種の質量を測定すると、C末端アミノ酸配列を反映した質量差を示す一連のピークが測定できる。具体的には、各反応産物は、元のペプチドから逐次的なC末端アミノ酸分解反応で生成される結果、例えば、元のペプチドから数アミノ酸残基が除去された反応産物までの、数種の一連の反応産物群に関して、質量分析法を利用することで、対応するイオノン種の質量を一括して分析することができ、

かかる数アミノ酸残基分のC末端アミノ酸配列を一括して決定できる。

なお、例えば、核酸プロープやプライマーの作製に利用するC末端アミノ酸配列の情報は、通常、かかるアミノ酸配列をコードする塩基配列として、18塩基長～24塩基長程度、従って、6アミノ酸～8アミノ酸程度であってもよく、10数アミノ酸残基に達するC末端アミノ酸配列の解明を必要とするのは、極めて特殊な場合のみである。従って、上記のパーフルオロアルカン酸またはパーフルオロアルカン酸無水物の蒸気を気相から供給しつつ、乾燥したペプチドに作用させて、逐次的なC末端アミノ酸分解反応により、例えば、10アミノ酸残基の除去に達する一連の反応産物を同時に含有する処理試料を調製するこれらの手段は、前記の用途に適合したものである。

発明の開示

これらパーフルオロアルカン酸またはパーフルオロアルカン酸無水物の蒸気を気相から供給しつつ、乾燥したペプチドに作用させる手法は、有用なC末端アミノ酸配列の解明手段ではあるものの、気相から供給される反応試薬を利用する反応であるため、分析対象となるペプチド試料は、単離・精製を施し、さらに、乾燥処理を行ったペプチド純品とした上で、かかる解析手段を適用していた。従って、予め単離・精製を実施した後、乾燥済みのペプチド純品が入手できることが、かかる気相から供給される反応試薬を利用する解析方法の適用の前提となっていた。

一方、そのアミノ酸配列は既に判明している、既知のペプチドやタンパク質が、特定の細胞組織内に存在しているか否かを確認する手段としては、特定の細胞組織内から採取された、多数のペプチドやタンパク質を含む混合試料について、ゲル電気泳動法による分離を行う方法、例えば、SDS-PAGE法では、ポリアクリルアミド・ゲル担体上で、その分子量に応じたスポットを示す、各ペプチドやタンパク質の存在を確認する手法が汎用されている。あるいは、等電点泳動法を利用して、ペプチドやタンパク質をその等電点に応じて、分離するスポットに

単離する手法が汎用されている。加えて、二次元電気泳動法では、二種の泳動法を組み合わせる結果、分子量や等電点の相違に応じて、ペプチドやタンパク質を二次元的に細分化したスポットとして単離される。その際、ゲル担体上に検出されるスポットを与えてペプチドが、実際に目的とするペプチドであるか否かの検証を行う必要がある。

例えば、この目的とするペプチドであるか否かの検証では、場合によっては、目的のペプチドに対して、特異的な反応性を示す抗体を反応させ、かかる抗原・抗体反応の有無を検出する方法が利用されている。但し、この検証方法は、特異的な反応性を示す抗体が入手可能な場合にしか適用できない。

従って、特異的な反応性を示す抗体を利用することなく、ゲル担体上に検出されるスポットを与えてペプチドが、実際に目的とするペプチドであるか否かの検証を行うことが可能な手段の提供が望まれている。

また、前記抗原・抗体反応を利用する検証法を可能なタンパク質は限られているため、ペプチド・マス・フィンガープリント (PMF) 法と称される手法を利用する検証法も利用されている。この PMF 法は、目的とするペプチドに関して、予め、切断部位に特異性を有するプロテアーゼ、例えば、トリプシンなどを利用して酵素消化した際、生成するペプチド断片個々の分子量が判明している場合、単離されたペプチドを、同じ酵素消化によってペプチド断片化し、質量分析法を利用してペプチド断片の各分子量を測定し、データ・ベースに収録されているペプチド断片個々の分子量と対比することで、同一性の検証を行う。

加えて、質量分析法を利用してペプチドを分析する際、MALDI-TOF型質量分析法を利用して分離したイオン種について、更に、電子線照射により、かかるイオン種から生成する二次イオン種の質量を分析する、TOF-SIMS 法などの、MS/MS 法を利用することで、各ペプチド断片の部分構成に関する情報も利用可能となっている。例えば、これら MS/MS 法を利用することで、場合によっては、ペプチドの N 末端、および C 末端配列を特定できるものもある。

前述の PMF 法、さらには、MS/MS 法を利用することで、抗原・抗体反応

を利用する場合と比較すると、その利用可能な範囲は格段に拡大するものの、そのアミノ酸配列が既知である上に、予め、各ペプチド断片に由来するイオン種を特定したデータ・ベースが完備しているタンパク質やペプチドに、その利用範囲は限られるものである。従って、実際に、ゲル担体上に検出されるスポットを与えて 5 いるペプチドが、そのアミノ酸配列が既知である対象のペプチドであるか否かの検証をより一般的に行うことが可能な手段の提供が望まれている。

本発明者らは、かかる要望を満足する手段として、そのアミノ酸配列は既に判明している、既知のペプチドやタンパク質に関しては、同一条件でゲル電気泳動法による分離を行うと、それぞれ固有の位置に相当の再現性でスポットを与える 10 ため、対応する位置にスポットを生じているペプチドの部分アミノ酸配列を分析し、それが既知のアミノ酸配列中の対応する部分配列と一致するか否かを検証する手段が利用可能であろうと着想した。より具体的には、例えば、SDS-PAGE 法、あるいは二次元泳動法を利用する際、ゲル担体上に検出されるバンド、あるいはスポットを与えて 15 いるペプチドのおおよその分子量は判明しており、その C 末端アミノ酸配列を検出して、アミノ酸配列は既に判明している既知のペプチドの分子量、ならびにその C 末端アミノ酸配列と一致するか否かを検証することで、かかるスポットを与えて 20 いるペプチドが、実際に目的とするペプチドであるか否かの検証を行うことが可能となると着想した。

この着想を実施する上で、ゲル担体上に検出されるスポットを与えて 25 いるペプチドに関して、ゲル担体を切断した上で、一旦ゲル中から当該ペプチドを抽出・溶解した上で、再度、液相から単離・回収する操作を行い、従来の C 末端アミノ酸配列解析手段を適用することも、原理的には可能である。しかしながら、現実的には、再度、液相から単離・回収する操作における回収効率は必ずしも高くなく、多くの場合、アミノ酸残基数の多いペプチドでは回収効率は極端に低いため、対象とする当該ペプチドをゲル担体上に担持された状態のまま、その C 末端アミノ酸配列を解析することが、より広範な解析対象において、上記の着想を実施する上で必要となることを、本発明者らは見出した。

本発明は前記の課題を解決するもので、本発明の目的は、ゲル電気泳動法により分離される解析対象のペプチド、具体的には、タンパク質などのアミノ酸残基数の多いペプチド鎖について、当該ペプチドをゲル担体上に担持した状態のまま、そのC末端アミノ酸を、オキサゾロン環構造の形成を経由する反応機構を利用して、逐次的に分解する際、ペプチド途中におけるペプチド結合の断続などの好ましくない副次反応を抑制でき、同時にかかる化学的な処理自体は、汎用性の富む条件で実施することが可能な、逐次的C末端アミノ酸の分解反応手段を提供することにある。より具体的には、本発明の目的は、ゲル担体上に担持した状態において、ゲル状物質に含有される水分を除去して、ペプチドを乾燥した後、そのC末端アミノ酸を逐次的に分解する際、かかるゲル内分の穴構造に留まるペプチドに対して、かかる化学的な処理を施す反応試薬を均一に供給でき、また、室温近傍の穏和な条件で実施できる新規な逐次的C末端アミノ酸の分解反応手段を利用する、ペプチドC末端アミノ酸配列の解析方法を提供することにある。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、鋭意検討と研究を繰り返したところ、ゲル電気泳動法に利用されるゲル状物質は、そもそも、ペプチドの通過可能な微細な穴構造を有し、水を含浸した状態であり、オキサゾロン環構造を形成する反応を行う際には、ゲル状物質中に含浸される水を除去する必要があること、一方、ゲル状物質から水を除去し、乾燥させると、微細な穴構造中を満たしている水分子が除かれる結果、ゲル全体の嵩体積が減少し、この狭くなった微細な穴構造内部へ、反応試薬を蒸気として均一に供給することは困難であることを確認した。本発明者らは、さらに、反応試薬の供給法を検討したところ、脱水操作によって、内部の微細な穴構造が狭くなったゲルを、水を含まず、かつ、ペーフルオロアルカン酸、酸無水物などの反応試薬を溶解できる有機溶媒を利用して再び膨潤させて、内部の微細な穴構造の間隙を広くした上で、その間隙を介して、前記有機溶媒中に溶解した反応試薬をゲル内部へと均一に供給することが可能であることを見出した。より具体的には、脱水処理を施したゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状

態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、ペーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液を用いて、該混合溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物とペーフルオロアルカン酸とを作用させ、C末端でのオキサゾロン環構造を形成、その後の、末端アミノ酸残基の解離、ならびに、オキサゾロン環構造を形成という一連の反応が実施できることを見出した、本発明者らは、これらの知見に加えて、反応で生じる反応生成物である短縮されるペプチド、元のペプチドとともに、かかる双極性非プロトン性溶媒で膨潤したゲル中では、拡散、溶出は生じることなく、ゲル担体上に担持した状態に維持され、質量分析法により同時に分析することが可能であることを確認し、本発明を完成するに到った。

すなわち、本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、解析対象とするペプチドのC末端アミノ酸配列を解析する方法であって、対象とするペプチドより、化学的手段によりC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物を含む混合物を調製する工程と、

前記一連の反応生成物と、元となるペプチドとの分子量差を、質量分析法により分析し、かかるC末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程と、

測定された一連の分子量減少量に基づき、逐次的分解された一連のアミノ酸を特定し、C末端より配列させて、C末端のアミノ酸配列情報を得る工程とを具え、

前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程は、

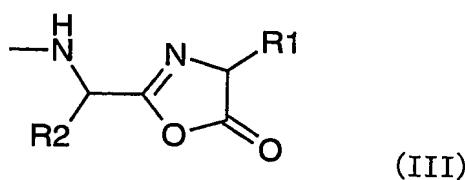
予めゲル電気泳動法による分離がなされ、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、

前記ゲル担体中に含浸される水溶媒を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釀除去することにより、該ゲル担体の脱水処理を行う工程と、

前記脱水処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチ

ド試料に対して、30°C～80°Cの範囲に選択される温度において、該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液を用いて、該混合溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とを作用させ、

ペプチドのC末端において、下記する一般式 (III) :



10 (式中、

R 1 は、ペプチドのC末端アミノ酸の側鎖を表し、

R 2 は、前記C末端アミノ酸の直前に位置するアミノ酸残基の側鎖を表す) で表記される 5-オキサゾロン構造を経て、該 5-オキサゾロン環の開裂に伴いC末端アミノ酸の逐次的分解を行う工程と、

15 前記C末端アミノ酸の逐次的分解反応に利用した混合溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、前記パーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、分解反応の停止と反応試薬の除去を行う工程とを有する、対象とするペプチド試料を該ゲル担体上に担持された状態で処理する方法によりなされ、

該ゲル担体上に担持された状態のまま、前記のC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理を施して、得られる一連の反応生成物ならびに元となるペプチドとを含む混合物を、前記質量分析工程に供することを特徴とするペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法である。

25 その際、前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるアルカン酸無水物として、炭素数 2～4

のアルカン酸の対称型酸無水物を用いることが好ましい。更には、前記炭素数2～4のアルカン酸の対称型酸無水物として、炭素数2～4の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物を用いることがより望ましい。例えば、前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるアルカン酸無水物として、無水酢酸を用いることが一層好ましい。

一方、前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるパーフルオロアルカン酸として、当該パーフルオロアルカン酸の示すpKaは、0.3～2.5の範囲であるパーフルオロアルカン酸を用いることが好ましい。例えば、前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるパーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸を用いることが可能である。さらには、前記炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4の直鎖パーフルオロアルカン酸を用いることがより望ましい。なお、前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液中における、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸との含有比率は、アルカン酸無水物100容当たり、パーフルオロアルカン酸1～20容の範囲に選択することがより望ましい。

加えて、前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中の反応処理に際して、

前記反応系は、水分に加えて、酸素も除去された乾燥雰囲気下に保たれることがより望ましい。

なお、本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法において、前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程では、前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中の反応処理後、極性非プロトン性溶媒を用いて、該混合溶液を希釈除去することにより、分解反応の停止と反応試薬の除去を行う工程を終えた後、

さらに、前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する反応で得られる一連の反応生

成物を含む混合物に対して、該ゲル担体上に担持された状態のまま、
塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を溶解する水溶液を利用し、
該水溶液中にゲル担体を浸漬することにより、前記塩基性の窒素含有有機化合物
の共存下、前記反応生成物ペプチドに水分子を作用させ、加水処理を施し、

5 次いで、前記ゲル担体中に含浸される水溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起
こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈
除去することにより、該ゲル担体の再脱水処理を施すことからなる、附加的な加
水処理と再脱水処理の工程を設けることが好ましい。

また、前記附加的な加水処理と再脱水処理の工程は、

10 前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中の反応処理後、
極性非プロトン性溶媒を用いて、該混合溶液を希釈除去することにより、分解反
応の停止と反応試薬の除去を行う工程に代えて、

温度を低下させ、分解反応の停止を図った後、

さらに、前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する反応で得られる一連の反応生
15 成物を含む混合物に対して、該ゲル担体上に担持された状態のまま、
塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を溶解する水溶液を利用し、
該水溶液中にゲル担体を浸漬することにより、前記塩基性の窒素含有有機化合物
の共存下、前記反応生成物ペプチドに水分子を作用させ、加水処理を施し、

同時に、前記パーカルオロアルカン酸とアルカン酸無水物とを組み合わせてな
20 る反応試薬の不活性処理ならびにゲル中からの溶出を行い、

次いで、前記ゲル担体中に含浸される水溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起
こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈
除去することにより、該ゲル担体の再脱水処理を施すことからなる、附加的な加
水処理と再脱水処理の工程として実施することもできる。

25 更には、前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程では、
前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中の反応処理に先立ち、
前記脱水処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチ

ド試料に対して、30°C～80°Cの範囲に選択される温度において、該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、アルカン酸無水物を溶解してなる溶液を用いて、該アルカン酸無水物溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物を作用させ、対象とするペプチドのN末端のアミノ基に、予め、前記アルカン酸無水物を構成するアルカン酸に由来するアシル基によるN—アシル化保護を施し、

次いで、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、前記アルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、N—アシル化反応の停止と反応試薬の除去を行う前処理工程を設けることが好ましい。その際、該N末端に対するN—アシル化保護を施す前処理工程で利用する前記アルカン酸無水物と、その後に実施する前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程で利用する前記アルカン酸無水物とに、同じアルカン酸無水物を用いることがより好ましい。

また、前記のN—アシル化を行う前処理工程は、

前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中の反応処理に先立ち、

前記脱水処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、30°C～80°Cの範囲に選択される温度において、

該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、アルカン酸無水物を溶解してなる溶液を用いて、該アルカン酸無水物溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物を作用させ、対象とするペプチドのN末端のアミノ基に、予め、前記アルカン酸無水物を構成するアルカン酸に由来するアシル基によるN—アシル化保護を施し、

その後、温度を低下させ、分解反応の停止を図るとともに、水を加えて、前記アルカン酸無水物の不活化処理ならびにゲル中からの溶出を行い、

次いで、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水、前記アルカン酸無水物

または対応するアルカン酸に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、該ゲル担体の再脱水処理を施すことからなる、N-アシル化反応の前処理工程として実施することもできる。

一方、予めゲル電気泳動法による分離がなされ、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料の調製は、

該ゲル担体として、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる電気泳動法を利用してなされることが、一般に望ましい。また、前記一連の反応生成物と、元となるペプチドとを、質量分析法により分析する工程において、該質量分析法として、MALDI-TOF型質量分析法を選択することがより好ましい。

10

図面の簡単な説明

図1は、本発明にかかるペプチドからC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理における、操作手順の特徴点を例示する工程フローを示す図である。

図2は、本発明にかかるペプチドからC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理方法に従って、ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖のC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる反応産物混合物の質量分析スペクトルの一例を示す図である。

図3は、参考例に記載する、単離乾燥ペプチドからC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理方法に従って、ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖のC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる反応産物混合物の質量分析スペクトルの一例を示す図である。

図4は、ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖に含まれる、N-アセチル化を受けるリシン残基、ならびに、トリプシン消化による、アルギニン残基のC末側ペプチド結合切断で生じる、1-31と140-153の各部分アミノ酸配列を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明をより詳しく説明する。

本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、基本的には、解析対象のペプチドに対して、そのペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解除去して、ペプチドが短縮された一連の反応産物を作製し、この一連の反応産物の分子量と、元となるペプチドの分子量との差異に基づき、除去されたアミノ酸を特定する手法を採用している。より具体的には、この一連の反応産物の分子量と、元となるペプチドの分子量の測定手段として、質量分析法を利用するが、そのイオン化過程で、ペプチドを構成するアミノ酸残基から、一部に原子団の欠落を生じない条件での測定により適する質量分析装置、例えば、MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析) 装置などを利用することが好ましい。

一方、本発明にかかる解析方法における最大の特徴は、

C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程においては、対象とするペプチド試料は、予めゲル電気泳動法による分離がなされ、この電気泳動法に利用されるゲル担体上に担持された状態で、一連の反応操作を実施した上で、さらには、最終的に生成する一連の反応産物の分子量と、元となるペプチドの分子量とを測定する質量分析の直前に、担持されたゲル担体上から遊離処理を行うことで、サンプル量の僅かな場合にも、再現性の高い測定を行うことを可能としている。その際、質量分析装置、例えば、MALDI-TOF-MS 装置などを利用することで、ゲル担体上において、単一のスポットを形成する対象とするペプチド試料部分のみを、高い分子量分解能、確度で測定することが可能となる。換言するならば、予めゲル電気泳動法による分離がなされ、個々のスポット（または、バンド）を構成している複数種のペプチド試料に対して、同一の工程で、そのC末端アミノ酸を逐次的に分解する操作を一括して行った後、個々のスポット（または、バンド）のゲル切片を分離し、その後の質量分析に供することで、原サンプル中に含

有されている複数種のペプチド試料のC末端アミノ酸配列解析を、高い効率と、均一性で実施することが可能である。

なお、予めゲル電気泳動法による分離を行う際、利用されるゲル状物質は、特定の分子量範囲に相当する複数種のペプチドに関して、それぞれ個別な、分離されたスポット（又は、バンド）を示す条件、具体的には、ゲルを構成するポリアクリルアミドの含有比率を選択し、ゲル内部に形成される微細な穴構造内部の間隙サイズを調整する。その結果、分離されたスポット（又は、バンド）は、例えば、二次元電気泳動法やSDS-PAGE法では、それぞれペプチド鎖分子量、表面の電荷量の差異に起因する電気泳動速度の相違するペプチドが局在している。

かかるペプチドは、ゲル中に形成される微細な穴構造内部に保持されており、ゲル状物質中に含浸される水を除去する際、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、水溶媒のみを該極性非プロトン性溶媒中に希釈・溶出する手法を利用すると、かかる脱水処理操作を終えた後も、目的とするペプチドは、分離されたスポット（又は、バンド）位置のゲル担体上に担持された状態に維持できる。かかる脱水処理に利用する極性非プロトン性溶媒は、ゲルを構成するポリアクリルアミドなどのゲル状物質との親和性は、水溶媒より一般に劣っているため、ゲル状物質中の微細な穴構造の間隙サイズを維持していた、間隙表面に対して溶媒和している水溶媒の除去とともに、嵩体積の減少が進む。該脱水処理に利用する極性非プロトン性溶媒として、例えば、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる際、好適な極性非プロトン性溶媒として、水に対して親和性に富む、アセトニトリル（CH₃CN）などの炭素数4以下のニトリル類、アセトンなどの炭素数4以下のケトン類などを挙げることができる。

すなわち、前記脱水処理に利用する極性非プロトン性溶媒を、その後、蒸散・乾固すると、嵩体積が減少し、収縮したゲル担体となり、狭くなったゲル状物質中の微細な穴構造の間隙を介して、ゲル担体内部まで、気相から反応試薬のペルフルオロアルカン酸、あるいは、ペルフルオロアルカン酸無水物、例えば、ベン

タフルオロプロパン酸 ($\text{C F}_3\text{C F}_2\text{COOH}$) を蒸気として均一に供給して、ペプチドの C 末端アミノ酸に作用させることは困難となる。

本発明の方法においては、上記の脱水処理に伴い、嵩体積が減少し、収縮した

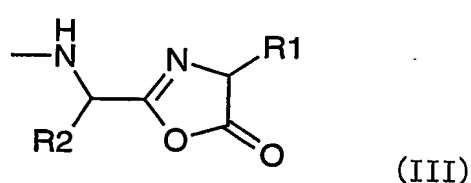
5 ゲル担体に対して、当該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、

双極性非プロトン性溶媒を利用して、再び膨潤させることで、微細な穴構造の間隙を拡大させる。その際、このゲルの膨潤に利用する双極性非プロトン性溶媒中に、ペーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液を利用することで、ゲル担体の微細な穴構造中に担持されてい

るペプチドに、ペーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物を均一に供給して、

10 作用させる。

このペーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物は、例えば、以下に述べる反応機構を介して、ペプチドの C 末端において、下記する一般式 (III) :

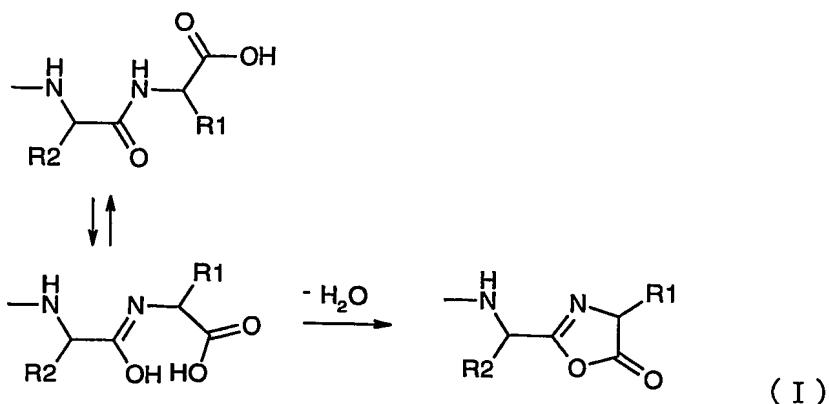


15 (式中、

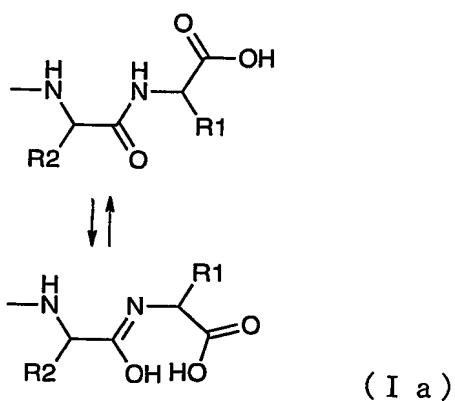
R 1 は、ペプチドの C 末端アミノ酸の側鎖を表し、

R 2 は、前記 C 末端アミノ酸の直前に位置するアミノ酸残基の側鎖を表す) で表記される 5-オキサゾロン構造を先ず形成させる。

かかる 5-オキサゾロン環形成の反応は、全体として見ると、反応式 (I) :



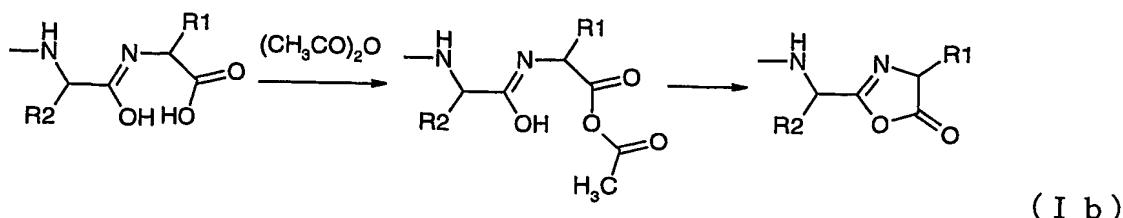
として表記されるものの、本発明にかかるC末端アミノ酸の選択的な分解方法では、先ず、下記する反応式 (I a) :



5

で示されるケトーエノール互換異性化の過程を、パーフルオロアルカン酸を乾燥したペプチドに対して、プロトン供与体として機能させることで、エノール型をとる比率を高めている。

次いで、エノール型において、表出されているヒドロキシ基とC末端カルボキシ基の間で、分子内エステル結合を形成し、5-オキサゾロン環を完成させる。その際、本発明にかかるC末端アミノ酸の選択的な分解方法では、C末端カルボキシ基の活性化を行い試薬として、アルカン酸無水物を利用し、例えば、下記の反応式 (I b) :



で例示されるような、非対称型酸無水物へと変換し、活性化されたC末端カルボキシ基が反応に関与するものとしている。アルカン酸無水物は、パーフルオロアルカン酸と比較して、高い濃度で含有されており、かかる反応は、穏和な温度条件で進行でき、反応温度を30°C~80°Cの範囲に選択することが可能となっている。

一方、本発明にかかるC末端アミノ酸の選択的な分解方法において、利用されるパーフルオロアルカン酸は、そのプロトン供与能を利用するものであり、該パーフルオロアルカン酸の示すpKaは、0.3~2.5の範囲であるパーフルオロアルカン酸を用いることが好ましい。なお、前記の反応温度において、利用する双極性非プロトン性溶媒中に均一に溶解可能な、炭素数2~4のパーフルオロアルカン酸は、より適するものであり、さらには、直鎖状の炭素数2~4のパーフルオロアルカン酸が、より適するものであり、具体的には、トリフルオロ酢酸(CF₃COOH)、ペンタフルオロプロパン酸(CF₃CF₂COOH)、ヘプタフルオロブタン酸(CF₃CF₂CF₂COOH)を利用することがより望ましい。

また、利用されるアルカン酸無水物は、反応温度まで昇温した際、適正な反応性を与えるものが好ましく、従って、炭素数2~4のアルカン酸の対称型酸無水物を用いることが好ましい。なかでも、前記対称型酸無水物として、炭素数2~4の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物を用いることがより好ましく、特には、炭素数2の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物、すなわち、無水酢酸が好適に利用できる。かかるアルカン酸無水物は、C末端カルボキシ基の活性化に利用されるため、その際、立体障害を生じることの少ないものが好ましく、その点でも、前記例示の無水酢酸などがより好適である。

また、上記する活性化試薬として利用される、アルカン酸無水物は、反応に従って、消費されるため、予め、ゲルの膨潤に利用する双極性非プロトン性溶媒中

に、ペプチドとの反応に消費される量に対して、大過剰量を溶解しておき、その濃度低下を抑制することが望ましい。具体的には、ゲルの膨潤に用いる混合溶液中において、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸との含有比率は、アルカン酸無水物 100 容当たり、パーフルオロアルカン酸 1 ~ 20 容の範囲に選択 5 し、その際、双極性非プロトン性溶媒中における、アルカン酸無水物の含有濃度は、10 ~ 30 % (体積%) の範囲に選択することがより望ましい。反応時間は、反応温度、双極性非プロトン性溶媒中に含有されるアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸の含有濃度に依存し、加えて、極性非プロトン性溶媒を利用する脱水処理に伴って、収縮したゲル担体の膨潤に要する時間をも考慮して、適宜選 10 択することが望ましい。例えば、ポリアクリルアミド・ゲル (12.5 質量%) に対して、上述のアセトニトリルを利用して脱水処理を施した後、後述のホルムアミドなどの双極性非プロトン性溶媒中に浸漬して、ゲル担体の再膨潤を達成するに要する時間は、例えば、40 °C では、3 時間程度であるため、全体の反応時間は、かかるゲル担体の再膨潤を終えた後、所望のアミノ酸残基数、C 末端アミ 15 ノ酸の選択的な分解を達成するに要する時間を加えたものに選択する。

一方、上記のゲルの再膨潤を起こさせる双極性非プロトン性溶媒は、該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、比較的に分子サイズが小さく、かつ、ゲル状物質に対する親和性に優れた有機溶媒が好ましい。加えて、上述する式 (I a) のケトーエノール互換異性化の過程において、そのエノール体の比率を維持可能な、高い双極性を示すとともに、溶質分子のアルカン酸無水物、パーフルオロアルカン酸、ならびに、反応副生成物であるアルカン酸に対して、優れた溶媒であることが好ましい。なお、上記反応温度において、揮発・蒸散することの少ない双極性非プロトン性溶媒が、より好ましく、例えば、ホルムアミド (HCONH₂) などは、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる際、以上に述べた要件全てを十分に満足するものである。

なお、上述するアルカン酸無水物、パーフルオロアルカン酸、ならびに、反応副生成物であるアルカン酸に対して、優れた溶解性をもたらす双極性非プロトン

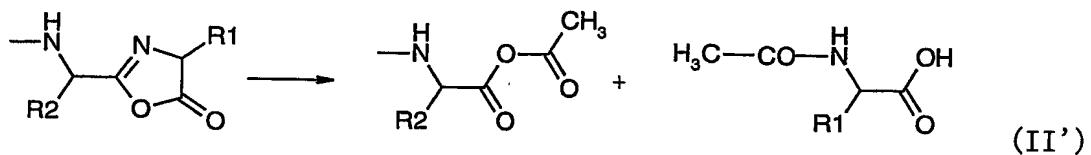
性溶媒は、水分子をも容易に溶解することが可能である。従って、前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中の反応処理に際して、前記反応系は、水分を除去した、乾燥雰囲気下に保たれることが好ましい。すなわち、上記の式(I b)に示される反応中間体、非対称型酸無水物へと変換し、活性化されたC末端カルボキシ基は、反応系内に水分子が混入すると、加水分解を受け、元の末端カルボキシ基へと戻ってしまう。かかる不活性過程を回避するため、反応系は、水分を除去した状態を維持することが好ましい。

10 例えれば、対象とするペプチドを構成するアミノ酸残基のうち、メチオニンに存在するイオウが、系内に混入する酸素により酸化を受け、その式量が変化することもある。この酸素による酸化を防止することは、分子量の測定を基礎とする本発明の方法においては、かかる酸化を抑制することは、より高い確度を達成する上で、より好ましいものとなる。

15 なお、対象とするペプチドが、例えば、隣接するペプチドのシステインとの間で、酸化型の—S—S—結合を形成する、あるいは、同一分子内で—S—S—結合を形成しているシステインを含む場合には、予め常用の還元処理を施し、かかる架橋を解消し、還元型のシステインを含むペプチドに変換する。加えて、多くの場合、解析の対象とするペプチド中に存在する還元型のシステインに対しては、その側鎖のスルファニル基(—SH)にカルボキシメチル化やピリジルエチル化などを施し、予めその保護を行う。一方、還元型のシステインに対して、予めその保護を施していない場合には、系内に混入する酸素により酸化を受け、場合によつては、再び酸化型の—S—S—結合を形成する懸念もある。本発明においては、予め、対象とするペプチドは、高次構造を解消したペプチドであるものの、隣接するペプチド間で、不要な—S—S—結合が形成されることを回避する上では、前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中の反応処理に際して、反応系は、水分に加えて、酸素も除去された乾燥雰囲気下に保たれることがより望ましい。また、メチオニン残基のスルフィド(—S—)に対する酸化を防止する上でも、酸素も除去された乾燥雰囲気下に保たれることがより望ましい。

例えば、反応系を、水分に加えて、酸素も除去された乾燥雰囲気下に保つ手段としては、反応を行う系を気密状態とし、系外からの、水分、酸素の浸入を防止するとともに、液の注入、排出操作も、乾燥処理した不活性気体、例えば、窒素雰囲気下で行うことが望ましい。

5 また、本発明にかかるC末端アミノ酸の選択的な分解方法においては、一旦形成された5-オキサゾロン環から、例えば、反応式 (II') で表記される反応：



等の反応を経て、C末端のアミノ酸の離脱と、次段の反応中間体の形成を進行して、逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解が進むと推断される。従って、かかる反応を終えた後、得られる反応産物は、上述する反応式 (II) に示される、C末端にカルボキシ基が表出されているもの以外に、中間産物である5-オキサゾロン環構造に留まるもの、あるいは、反応中間体の一形態として、C末端が非対称型酸無水物に至ったものも混入したものとなる。

10 かかる逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解処理工程における反応は、少なくとも、反応式 (I b) で例示される5-オキサゾロン環構造の形成過程と、反応式 (II') で例示される5-オキサゾロン環構造の開裂による末端アミノ酸の分離過程との二段階の素反応から構成される。そのため、全体の反応速度は、これら各過程の反応速度の双方に依存するものの、主に、利用するアルカン酸無水物とペーフルオロアルカン酸の濃度ならびに反応温度に依存している。加えて、一連の反応産物は、逐次的な反応で形成されるため、得られる一連の反応産物において達成される、短縮されるC末端アミノ酸配列の最大長は、処理時間が長くなるとともに、延長される。従って、かかる逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解処理工程における処理時間は、主に、利用するアルカン酸無水物とペーフルオロアルカン酸の濃度ならびに反応温度に応じて、また、解析すべきC末端アミノ酸配列の目標とするアミノ酸長をも考慮して、適宜選択するものである。

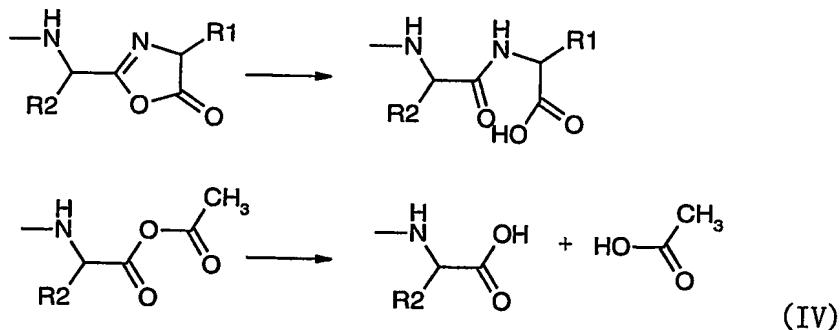
逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解反応の停止は、反応系の温度を低下するとともに、ゲル担体中に浸潤している反応試薬、すなわち、ペーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物を希釈・除去することで行う。具体的には、C末端アミノ酸の逐次的分解反応に利用した混合溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起こす、かつ、前記ペーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、分解反応の停止と反応試薬の除去を行う。なお、かかる反応試薬の希釈・除去に、混合溶液の調製に利用する双極性非プロトン性溶媒を利用することも可能であるが、反応式(Ib)で例示される5-オキサゾロン環構造の形成過程を停止する上では、エノール型中間体の安定化に寄与の少ない極性非プロトン性溶媒を利用する、ペーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒の除去工程とすることがより望ましい。少なくとも、反応試薬の希釈・除去工程の最終段では、極性非プロトン性溶媒を利用する希釈・除去の操作を設ける。例えば、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる際、これらの条件を満足する極性非プロトン性溶媒としては、アセトニトリル(CH_3CN)などの炭素数4以下のニトリル類、アセトンなどの炭素数4以下のケトン類などを挙げることができる。

また、本発明の方法では、逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解処理工程において生成される、上記反応式(II')に例示されるC末端にカルボキシ基が表出されていない反応中間体の形態をとるものも、C末端にカルボキシ基が表出されている形態に復する目的で、付加的な加水処理を設けることができる。すなわち、前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する反応で得られる一連の反応生成物を含む混合物に対して、該ゲル担体上に担持された状態のまま、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を溶解する水溶液を利用し、該水溶液中にゲル担体を浸漬することにより、前記塩基性の窒素含有有機化合物の共存下、前記反応生成物ペプチドに水分子を作用させ、加水処理を施し、次いで、前記ゲル担体中に含浸される水溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起

こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、該ゲル担体の再脱水処理を施すことからなる、付加的な加水処理と再脱水処理の工程を設けることが好ましい。この後処理を施すことでの、反応産物は、C末端にカルボキシ基は表出した形態となり、かかる形態が、その後、質量分析法により分析した際、主要なピークを与えるものとなり、ピーク強度をも参考として、一連の反応産物に対応する分子量を示すピークの特定作業をより容易とすることができる。

前記付加的な加水処理において、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物は、反応式 (II') に示される 5-オキサゾロン環構造、ならびに、次段の反応中間体（酸無水物体）の加水分解反応を触媒するものの、それ自体が、5-オキサゾロン環構造または反応中間体（酸無水物体）と反応して、不要な副生物を生じることがなく、好適な塩基触媒として機能する。具体的には、反応式 (II') に示される 5-オキサゾロン環構造、ならびに、次段の反応中間体（酸無水物体）の加水分解反応では、下記反応式 (IV) に示すように、反応産物のペプチド鎖の C 末端にカルボキシ基が表出する。

【化10】



なお、加水処理を利用する塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物が残余すると、反応産物の表出した C 末端にカルボキシ基に対して、かかる窒素塩基が付加塩を形成したものが混在する状態となるため、ゲル担体中に含浸される水溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、該ゲル担体の再脱水処理を施すとともに、加水処理を利用する塩基性含窒素芳香環化合物または

第三アミン化合物を水とともに、希釈除去することが好ましい。従って、この再脱水処理の工程において利用する極性非プロトン性溶媒は、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物に対しても、高い溶解性を有するものがより好ましい。例えば、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる際、これらの条件を満足する、
5 再脱水処理工程用の極性非プロトン性溶媒としては、アセトニトリル(CH_3CN)などの炭素数4以下のニトリル類、アセトンなどの炭素数4以下のケトン類などを挙げることができる。

上記の加水処理に利用する、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物は、例えば、残留しているC末端が非対称型酸無水物に至ったものと反応して、
10 アミド結合を形成することがなく、また、水溶液とした際、均一な溶液とできるので、好ましいものである。利用可能な、塩基性含窒素芳香環化合物としては、極性非プロトン性溶媒に高い溶解性を示す、単環式の含窒素芳香環化合物が好ましく、例えば、ピリジンはより好適に利用できる。また、利用可能な第三アミン化合物は、前記ピリジン塩基が示す比較的に弱い塩基性と同程度の塩基性を有するものが好ましく、例えば、DMAE (2-(ジメチルアミノ)エタノール: $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) などが好適に利用できる。例えば、ピリジンを利用する際には、水溶液全体の体積に対して、ピリジンを、5~15体積%の範囲、より具体的には、10体積%に選択することが好ましい。また、DMAEを利用する際には、水溶液全体の体積に対して、DMAEを、1~20体積%の範囲、より具体的には、10体積%に選択することが好ましい。

これら単環式の含窒素芳香環化合物や第三アミン化合物は、水溶液として、上記反応産物を担持しているゲルに作用させる。この後処理においては、親水性に富むゲル状物質中に、かかる有機塩基を含有する水溶液は、速やかに浸潤する。なお、速やかに加水反応を完了するためには、反応温度を60°C以上に選択することが好ましいが、一般に、密閉された反応容器内でかかる反応を行うため、反応容器内の機械的強度を考慮すると、100°C以下の範囲に選択することが望ましい。
25

加えて、上述する加水処理は、C末端アミノ酸の逐次的分解反応の後、一旦、反応試薬のアルカン酸無水物ならびにパーフルオロアルカン酸に対する、極性非プロトン性溶媒を利用する希釀・除去の操作を終えた後に実施するだけでなく、C末端アミノ酸の逐次的分解反応と該加水処理とを、連続して実施することも可能である。具体的には、C末端アミノ酸の逐次的分解反応は、その反応温度を下げて、その反応停止を図りつつ、有機塩基を含有する水溶液を加えると、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸の組み合わせてなる反応試薬の失活、ゲル中からの溶出が生じ、C末端アミノ酸の逐次的分解反応の停止と、反応試薬の不活性化・除去がなされる。引き続き、反応産物に対する加水処理も行うことができ、最終的に、極性非プロトン性溶媒を利用する再脱水処理工程を施すことで、有機塩基を含有する水溶液とともに、アルカン酸無水物に対応するアルカン酸とパーフルオロアルカン酸、双極性非プロトン性溶媒の除去と、再脱水がなされるため、一旦極性非プロトン性溶媒を利用する洗浄・除去操作を中間に設ける際と、実質的に差異を持たないものとなる。

さらには、本発明にかかるC末端アミノ酸の選択的な分解方法においては、前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合溶液を利用する処理の工程に加え、

かかるC末端アミノ酸を逐次的に分解する工程に先立って、
対象とするペプチドのN末端のアミノ基に、予め、前記アルカン酸無水物を構成するアルカン酸に由来するアシル基によるN-アシル化保護を施す前処理工程を設けることもできる。具体的には、前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物を利用する処理の過程で、ペプチドのC末端カルボキシ基の活性化がなされる反応中間体が形成されると推察される。この反応中間体が、隣接するペプチドのN末端のアミノ基と反応し、アミド結合を形成すると、目的とするペプチドの短縮された反応産物が得られないことになる。かかる反応中間体の生成反応は、ゲル状物質中の穴構造内に担持されているペプチドに対して起こるので、複数のペプチド反応中間体間で生じる前記偶発的な副次反

応の頻度は高くないものの、予め、N-アシル化保護を施すことがより望ましい。

加えて、前記アルカン酸無水物にペーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合溶液を利用する処理の間に、ペプチドのN末端のアミノ基に対して、前記アルカン酸無水物によって、N-アシル化が通常起こるため、系内において、N-アシル化保護がなされるものの、予め、N-アシル化保護を目的とする前処理を施す方がより望ましい。

このN末端のアミノ基にN-アシル化保護を施す前処理工程は、アルカン酸無水物を利用する反応であるため、ゲル状物質中に水が残留しない状態で実施することが望ましい。すなわち、ゲル状物質中に含浸される水を除去する脱水処理工程を終えた後、C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程に先立って、このN-アシル化保護を施す前処理工程を設ける。該アルカン酸無水物は、前記アルカン酸無水物にペーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合溶液の調製に利用される溶媒と同様の、双極性非プロトン性溶媒中に溶解した上で、かかる溶液中に、脱水処理済みのゲル担体を浸漬することで、ゲルの膨潤とともに、ゲル状物質中に浸潤する。

双極性非プロトン性溶媒中では、アルカン酸無水物の分子内分極が誘起され、求電子反応試薬として、該ペプチドのアミノ基に作用する結果、30°C以上でも、十分にかかるN-アシル化反応は進行する。通常、反応の促進を図るために、反応温度を50°C以上に選択することが好ましいが、一般に、密閉された反応容器内でかかる反応を行うため、反応容器内の機械的強度を考慮すると、100°C以下の範囲に選択することが望ましい。N-アシル化反応に付随して、アルカン酸が生成するが、その量は僅かであり、かかるアルカン酸の示すプロトン供与能と、共存するアルカン酸無水物とに起因する副次的反応は、上述の温度範囲では、通常問題とはならない。より具体的には、系内に生成するアルカン酸は、例えば、ペーフルオロアルカン酸と比較して、その酸触媒作用は格段に劣り、かつ、その存在量も少ないため、上述する温度条件では、ペーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物とを利用するC末端アミノ酸を逐次的に分解する工程における主な反

応、5-オキサゾロン環構造の形成反応が副次的に起こるまでには至らない。更には、上述するペーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物とを利用するC末端アミノ酸を逐次的に分解する工程においてすら、抑制されている種々の副次反応、例えば、ペプチド主鎖アミド結合（-CONH-）の開裂は、かかるアルカン酸無水物のみを利用する前処理工程においては、なお一層の抑制がなされている。
5

加えて、ペプチドのN末端のアミノ基をN-アシル化保護する際には、ペプチド中に存在するリシン残基側鎖のアミノ基に対しても、N-アシル化保護が同時に進行する。さらには、ペプチド中に存在するセリン残基ならびにトレオニン残基側鎖のヒドロキシ基においてもO-アシル化反応が進み、その保護がなされる。

10 その他、ペプチド中に存在するチロシン残基側鎖のフェノール性ヒドロキシ基も、その反応性は相違するものの、部分的にO-アシル化がなされる。これらの複数のアシル化保護もなされる前処理工程を設ける結果として、リシン残基側鎖のアミノ基、セリン残基ならびにトレオニン残基側鎖のヒドロキシ基は、何れも保護修飾を受けたものとなり、最早不要な副次反応に関与できないものとなる。その観点からも、かかるペプチドのN末端のアミノ基をN-アシル化保護する前処理工程をも実施することが、通常好ましい。
15

例えば、ペーフルオロアルカン酸蒸気を、水蒸気分子の共存下、例えば、90°Cに加熱しつつ、乾燥したペプチド鎖に作用させると、ペプチド鎖中のセリン残基（-NH-CH（CH₂OH）-CO-）において、 α 位のアミノ基（-NH-）と β 位のヒドロキシ基（-OH）の間で、N, O-アシル転位反応も進行し、引き続き、加水分解が進行し、セリン残基のN末側でペプチドの切断が生じるという副反応が存在する。また、条件に依っては、 β 位にヒドロキシ基（-OH）が存在しているトレオニン残基（-NH-CH（CH（CH₃）OH）-CO-）においても、同様の機構による加水分解が進行し、トレオニン残基のN末側でペプチドの切断が生じるという副反応が存在する。さらには、ペプチド鎖中のアスパラギン酸残基（-NH-CH（CH₂COOH）-CO-）において、C末のカルボキシ基から β 位のカルボキシ基へのペプチド結合の転位と、それに引き続く加

水分解が進行し、アスパラギン酸残基のC末端でペプチドの切断が生じるという副反応が存在する。

これら副次反応によりペプチド鎖の切断が生じると、そのN末端ペプチド断片に対しても、C末端アミノ酸の選択的な分解が同時に進行することになる。これらの副次反応に由来する反応産物が共存すると、場合によっては、目的とする反応産物の質量分析に際して、その測定を阻害する要因ともなる。

さらには、ペプチド鎖の切断に至らなくとも、 β 位のヒドロキシ基 ($-OH$) \rightarrow N末端部分ペプチドが連結された分岐型ペプチドとなると、その部位では、アミド結合が失われており、オキサゾロン環構造の形成がなされず、C末端アミノ酸の選択的な分解反応がそれ以上進行しないものとなる。

本発明の方法では、C末端アミノ酸の選択的な分解工程では、予め、脱水処理工程を設け、ゲル内に含浸される水を除去した上、反応系内に水が混入しない条件を選択し、また、パーカルオロアルカン酸の含有濃度を抑え、触媒量の範囲で反応を進める結果、上述する特定のアミノ酸残基におけるペプチド鎖の開裂、あるいは、ペプチド鎖の分岐などの副次反応は、抑制されている。加えて、パーカルオロアルカン酸よりも、格段に高い濃度で存在するアルカン酸無水物による、N-アシル化保護、O-アシル化保護の反応も、同時に進行するため、ペプチド鎖の開裂、あるいは、ペプチド鎖の分岐などの副次反応は、更に抑制・回避がなされている。しかしながら、パーカルオロアルカン酸の存在しない状況において、アルカン酸無水物を利用する前処理工程を予め実施すると、ペプチドのN末端のアミノ基をN-アシル化保護に加えて、ペプチド側鎖上のアミノ基やヒドロキシ基に対するアシル化保護がなされる結果、C末端アミノ酸の選択的な分解工程におけるペプチド鎖の開裂、あるいは、ペプチド鎖の分岐などの副次反応は、より確実に抑制・回避を行うことが可能である。

なお、この前処理工程で使用する、アルカン酸無水物を双極性非プロトン性溶媒に溶解する溶液中、アルカン酸無水物の含有比率は、反応温度に応じて、所望の反応性を達成できるように選択することができるものの、通常、双極性非プロ

トン性溶媒中、アルカン酸無水物の含有濃度を、10～30体積%の範囲、例えば、10体積%程度に選択することが好ましい。かかるアルカン酸無水物の含有濃度に対して、反応温度は、30°C～80°Cの範囲、好ましくは、50°C～80°Cの範囲に選択される温度、より好ましくは、かかる反応温度は、室温付近、あるいは、室温より僅かに高い範囲内に選択することが好ましく、より具体的には、50°C～60°Cの範囲に選択することが好ましい。反応時間は、反応温度、双極性非プロトン性溶媒中に含有されるアルカン酸無水物の含有濃度に依存し、加えて、極性非プロトン性溶媒を利用する脱水処理に伴って、収縮したゲル担体の膨潤に要する時間をも考慮して、適宜選択することが望ましい。

この前処理工程を終えた後、利用したアルカン酸無水物を双極性非プロトン性溶媒に溶解する溶液を除去し、さらに、上述する脱水処理工程に利用される極性非プロトン性溶媒を利用して、ゲル中に含浸されるアルカン酸無水物、双極性非プロトン性溶媒、生成するアルカン酸を希釈・除去することが望ましい。すなわち、ゲル中に含浸されているアルカン酸無水物溶液が残留した状態では、次に、C末端アミノ酸の選択的な分解工程を利用する、アルカン酸無水物にペーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合溶液中に、かかるゲル担体を浸漬した際、ゲル内部へのペーフルオロアルカン酸の浸入は速やかに進行しないものとなる。このゲル内部へのペーフルオロアルカン酸の供給をより確実に進めるため、脱水処理工程に利用される極性非プロトン性溶媒を利用して、ゲル中に含浸されているアルカン酸無水物溶液を、一旦希釈・除去することが望ましい。

但し、このN-アシル化保護する前処理工程における、反応停止と反応試薬の除去操作では、極性非プロトン性溶媒による希釈、洗浄を行う手法に代えて、温度を低下させ、分解反応の停止を図った後、水を加えて、反応試薬のアルカン酸無水物の不活性化、ゲル中のアルカン酸無水物、対応するアルカン酸の溶出を行うことで、反応停止と反応試薬の除去を行う方法を利用することもできる。この水を利用する反応停止を行った後、かかるゲル担体を浸漬する水を、上述する脱水処理工程に利用される極性非プロトン性溶媒を利用して、一旦希釈・除去する

脱水処理を行うことが必要である。すなわち、ゲル担体中に、水分が残留すると、C末端アミノ酸の選択的な分解反応における阻害要因となるため、上述するゲル電気泳動されたゲル担体に施される脱水処理工程と同様の極性非プロトン性溶媒を利用した、十分なリンス洗浄処理を実施する。

5 例えれば、本発明にかかるC末端アミノ酸の選択的な分解方法は、脱水処理工程、前処理工程、C末端アミノ酸の選択的な分解反応工程、後処理工程を全て備えた形態で実施することが、一層好ましいものである。その際、前処理工程、C末端アミノ酸の選択的な分解反応工程、後処理工程の各工程を終える段階では、その工程で利用した試薬をゲル中から除去することで、それぞれの反応を停止するため、上述するように、脱水処理工程に利用される極性非プロトン性溶媒と同様の、
10 極性非プロトン性溶媒を利用する、希釀・洗浄操作を設ける。この極性非プロトン性溶媒を利用する希釀・洗浄を終えた後、次の工程に移行する間、かかる極性非プロトン性溶媒中に浸漬した状態で、ゲル担体を一時保管することもできる。
15 あるいは、極性非プロトン性溶媒を蒸散・除去し、乾燥状態とした上で、ゲル担体を一時保管することもできる。

本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法では、上記のC末端アミノ酸の逐次的な除去により調製される一連の反応産物の分子量と、元のペプチドの分子量を、質量分析法による測定結果を利用して決定し、その分子量差に相当するアミノ酸を特定する。従って、通常、かかる質量分析法による測定に供する混合物中に、元のペプチドも、その分子量の特定が可能な程度残存する状態とすることが望ましい。

具体的には、本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、C末端アミノ酸配列として、最大10数アミノ酸長程度までの解析に適用するが、その際、対応する最大10数種に及ぶ一連の反応産物の含有比率は、その最小の含有比率のものは、最大含有比率のものの、少なくとも、1/10程度を下回らない状態とすることが望ましい。また、元のペプチドの残存量も、最大含有比率の反応産物に対して、少なくとも、1/10程度を下回らない状態とすることが望

ましい。一方、必要とするC末端アミノ酸配列情報は、10アミノ酸以内となることが多く、10アミノ酸程度の分解が進む程度に処理時間を選択すると、前記の含有比率に関する条件を満足することができる。

一方、分子量の測定に、質量分析法を利用するが、そのイオン化過程で、ペプチドを構成するアミノ酸残基から、一部に原子団の欠落を生じる、フラグメンテーションを抑制した条件でイオン化手段を具えた質量分析装置を利用する測定がより適している。また、ペプチドなどは高分子量であり、かかる高い分子量の測定に適する質量分析装置、例えば、MALDI-TOF-MS装置などを利用することが好ましい。特に、本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法では、解析対象のペプチド試料は、予めゲル電気泳動法による分離がなされ、ゲル担体上に担持された状態のまま、一連の処理を施し、最終的に、かかるゲル上のスポット部分より、処理を終えた反応産物を選択的に遊離・回収して、質量分析に供するが、その際、対応する陽イオン種と陰イオン種の双方を測定可能なMALDI-TOF-MS装置などを利用することが好ましい。

但し、これらの質量分析装置を利用しても、有効にイオン化を達成できる分子量には、自ずから上限があり、測定可能なペプチドのアミノ酸長の最大は、20～30アミノ酸を超えないことが望ましい。加えて、分子量差に基づき、対応するアミノ酸の特定を行うので、例えば、AsnとAsp、GlnとGluの如く、式量の差異が1のアミノ酸残基相互の区別を高い精度で行う上では、基準となる、最長のペプチド、すなわち、C末端アミノ酸の除去がなされていないペプチドの分子量は、3000を超えない範囲、より好ましくは、2000を超えない範囲であることがより好ましい。これをアミノ酸長に換算すると、長くとも、30アミノ酸、より好ましくは、20アミノ酸を超えない範囲とすることが好ましい。

本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法を、前記のアミノ酸長を遥かに超えるタンパク質などのペプチドへ適用する際には、質量分析の実施に先立ち、例えば、切断アミノ酸配列部位の特異性を有するプロテアーゼなどを利用して、ペプチドの特異的な分断処理を行い、C末端ペプチド断片として、上記

のアミノ酸長範囲とすることが望ましい。すなわち、元となるペプチド、ならびに、調製された一連の反応産物に対して、同じ部位特異的な分断処理を施すと、得られるC末端ペプチド断片は、そのN末端アミノ酸は同じであり、C末端アミノ酸部分に差異を有する一連のペプチド断片となる。その一連のペプチド断片を含む混合物を利用して、それらの分子量を質量分析法により特定することで、本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法を適用することができる。

すなわち、本発明では、ペプチドの特異的な分断処理を行うことで、ゲル担体上からの溶出が可能となるものの、C末端アミノ酸も逐次的な分解により得られる反応産物は、ゲル担体上に担持されている状態を保つもの、具体的には、元となるペプチド鎖のアミノ酸残基数は、少なくとも、50アミノ酸以上、通常、100アミノ酸以上となるものを主な対象とする。

この切断アミノ酸配列部位の特異性を有するプロテアーゼなどを利用した、ペプチドの特異的な分断処理は、通常、上記の加水処理を施す後処理工程に引き続き実施する。具体的には、後処理工程を終えた後、一旦、極性非プロトン性溶媒を利用する、希釀・洗净操作、ならびに、再脱水処理を施し、改めて、ゲル担体上に担持されているペプチド鎖に対して、該プロテアーゼを含む水性溶液を作用させる。その際、ゲル担体上に担持されているペプチド鎖は、ゲル中の穴構造に浸入するプロテアーゼの作用によって、その特異的な切断アミノ酸配列部位における切断の結果、複数のペプチド断片となる。このゲル担体上でのプロテアーゼによるペプチド断片化処理に利用可能な、プロテアーゼとしては、リシンやアルギニン残基のC末端側ペプチド結合を開裂するトリプシン、グルタミン酸残基のC末端側ペプチド結合を開裂するV8酵素などの、汎用されるペプチド断片化処理用のプロテアーゼを利用することが可能である。

また、ペプチドの特異的な分断処理は、前記切断アミノ酸配列部位の特異性を有するプロテアーゼ消化による他、例えば、メチオニン残基のC末側アミド結合における開裂に特異性を有するCNBrなどの化学的な試薬を利用する切断手法を利用することも可能である。

かかるプロテアーゼ消化、あるいは、化学的な切断手法を適用して、長いアミノ酸長のペプチド鎖より、得られるC末端側ペプチド断片を、所望のアミノ酸長の範囲とする上では、かかるプロテアーゼ消化、あるいは、化学的な切断における切断部位が、例えば、100アミノ酸当たり、10～2個程度、好ましくは、5 7～3個程度含有されていることが望ましい。前記の頻度で切断部位が存在していると、得られるペプチド断片の平均的なアミノ酸長は、10～50アミノ酸、好ましくは、15～35アミノ酸とでき、それに伴い、C末端側ペプチド断片も前記のアミノ酸長範囲とできる。すなわち、例えば、MALDI-TOF-MS装置などを利用する分子量測定において、好適な分子量範囲のC末端側ペプチド断片の調製が可能となる。その観点では、リシンやアルギニン残基のC末端側ペプチド結合を開裂するトリプシンを利用する際には、リシン残基に対しては、その側鎖上のアミノ基をN-アシル化保護し、アルギニン残基C末側のペプチド結合での切断のみに限定することで、切断部位の含有頻度を調整することが望ましい。

15 また、ゲル担体上に担持されているペプチド鎖は、その長いアミノ酸長に依つてゲル中の穴構造内に保持されているが、前記ペプチド断片化処理を受けると、アミノ酸長の短くなったペプチド断片は、容易にゲル担体から遊離され、例えば、プロテアーゼ溶液中に溶出する。この断片化処理に伴い、ゲル担体上から溶出するペプチド断片を回収する。次いで、例えば、緩衝液に含有される成分と分離するため、脱塩処理等を施して、ペプチド断片の粗製と、乾燥・回収を行う。

20 但し、本発明の方法を三次元構造を構成するタンパク質などの長いペプチドへ適用する際、長いペプチド中において、タンパク質フォールディングのため、システイン残基相互間で-S-S-結合を形成する場合には、予め、かかる-S-S-結合を還元し、システイン残基間の架橋を解消する必要があり、加えて、還元型のシステインに対して、カルボキシメチル化などの修飾を施し、側鎖のスルファンイル基(-SH)の保護を図る。加えて、タンパク質フォールディングに伴い、 α -ヘリックス等の二次構造を構成する部分では、アミノ酸残基のアミド結

合を構成するカルボニル基 (C=O) とイミノ基 (-NH-) は、分子内で水素結合を形成した状態となっている。この分子内で水素結合を形成した状態を保持したままであると、本発明で利用する反応の進行を抑制することもある。その点を考慮すると、少なくとも、ペプチドのC末端部分に関しては、二次構造を構成しない状態、例えば、デフォールディング処理が施された状態とした上で、かかるペプチド試料を、二次元電気泳動法や SDS-PAGE 法などのゲル電気泳動法によって、ゲル担体上において、単一スポットに分離することが望ましい。加えて、デフォールディング処理が施された状態とすることで、例えば、一連の化学的処理工程を終え、質量分析に先立ち、上述するプロテアーゼなどをを利用して、ペプチドの特異的な分断処理を行う必要がある場合にも、得られる C 末ペプチド断片の分離が一般に容易となる利点もある。

その他、本発明にかかるペプチドの C 末端アミノ酸配列解析方法は、鎖状ペプチドの C 末端アミノ酸配列決定だけでなく、例えば、環状ペプチドに関して、そのアミノ酸配列を決定するため、かかる環状ペプチドを予め開き、鎖状ペプチド化して、その C 末端アミノ酸配列決定に適用することもできる。より具体的には、種々の微生物等は、生物学的活性を有する環状ペプチド型化合物を產生しており、その部分アミノ酸配列の決定にも利用できる。更には、タンパク質によっては、複数のペプチド鎖が、その鎖間において、システイン残基相互間で -S-S- 結合を形成する形態を有する場合もあるが、その際には、予め、かかる -S-S- 結合を還元し、システイン残基間の架橋を解消し、個々のペプチド鎖を、ゲル電気泳動法により個別スポットに分離した上で、それぞれ C 末端アミノ酸配列の解析を行うことで、本発明の方法を適用することができる。

従って、本発明の方法を適用する際、対象とするペプチド試料は、鎖状ペプチドとし、予めゲル電気泳動法による分離を行い、該ゲル担体上に担持された状態の単一スポットとするが、該ゲル電気泳動法は、一次元方向に電気泳動をなす従来の SDS-PAGE 法は勿論のこと、ゲル上で二次元的に泳動を行い、より高い分離を行う、二次元泳動法を適用したものでもよい。かかる二次元泳動法を適

用して、分離されるペプチド試料は、夾雜物の混入がなく、より少ないサンプル量であっても、本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法によって、そのC末端アミノ酸配列決定が可能となる。また、予めゲル電気泳動法による分離を行う場合、対象とするペプチド中に、分子内におけるシステイン残基相互間で—S—S—結合を形成するものは、2—スルファニルエタノール (HS—C₂H₄—OH : 2—メルカプトエタノール)、DTT (ジチオトレイトール : トレオ—1, 4—ジスルファニル—2, 3—ブタンジオール) などの還元性試薬を添加して、還元状態で電気泳動を行い、単一のスポット化を行うことが好ましい。あるいは、予め、分子内におけるシステイン残基相互間での—S—S—結合を還元し、さらには、還元型のシステインに対して、ヨード酢酸などを利用するカルボキシメチル化などの修飾を施し、単一のスポット化を行うことが好ましい。

本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法では、分子量の差異に基づき、逐次的に除去されたアミノ酸を特定するため、同一の式量を有する、ロイシン (Leu) 残基とイソロイシン (Ile) 残基とを弁別することは原理的に不可能であり、この点は、従来の質量分析法を利用するC末端アミノ酸配列解析手法と同様である。また、C末端アミノ酸を除去する反応では、反応式 (I b) に例示するように、アミド結合のエノール型への変換と、それに続く、5—オキサゾロン環構造の形成が必須であり、アミド結合を構成するカルボニル基 (C=O) とイミノ基 (—NH—) が存在しない環状アミノ酸プロリン (Pro) がC末端アミノ酸となった時点で、それ以上の分解反応は進行しない。逆には、処理時間を延長した際、それ以上のC末端アミノ酸の除去が起きないことを確認することで、その要因となるアミノ酸残基は、環状アミノ酸プロリン (Pro) と推定することが可能である。

加えて、上述するゲル担体上でのプロテアーゼによるペプチド断片化処理によって、C末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物に由来するC末断片、ならびに、それ以外のペプチド鎖の中間部、N末側に由来する断片として、それらの分子量を測定することで、元となるペプチド鎖中に存在する、当

該プロテアーゼに特異的な切断アミノ酸配列部位の存在位置間隔、ならびに、C末端断片のN末端に、該特異的な切断アミノ酸配列部位が存在することなど、元となるペプチド鎖全体におけるアミノ酸配列における、付加的な特徴の特定を行うことが可能となる。

5 本発明にかかる方法では、ペプチドのN末端のアミノ基をN-アシル化保護する前処理工程、あるいは、C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程において、N末端のアミノ基に対するN-アルカノイル化、リシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-\text{CO}-$) の ϵ 位のアミノ基へのN-アルカノイル化、同時に、セリン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$) やトレオニン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH})-\text{CO}-$) に存在するヒドロキシ基に対するO-アルカノイル化、チロシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH})-\text{CO}-$) のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アルカノイル化がなされる。その後、後処理工程における、有機窒素塩基の存在下における加水処理に付随して、アルコール型ヒドロキシ基に対するエステル結合は、フェノール型ヒドロキシ基に対するエステル結合と比較して、より速やかに加水分解がなされる。その結果、後処理工程を施した、最終的に得られる反応産物においては、より高い選択性を持って、N末端のアミノ基に対するN-アルカノイル化、リシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-\text{CO}-$) の ϵ 位のアミノ基へのN-アルカノイル化、ならびに、場合によっては、チロシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH})-\text{CO}-$) のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アルカノイル化のみが残るものとなる。

20 例えれば、最終的に得られる反応産物において、セリン残基やトレオニン残基にアセチル化がなされたものが多数混入していると、かかる多アセチル化体と、脱アセチルがなされたものとの分子量差は、式量42の整数倍、具体的には、84、126、168は、セリン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$) の式量87、グルタミン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CONH}_2)-\text{CO}-$) の式量128、グルタミン酸残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH})-\text{CO}-$)

の式量 129、N-アセチルリシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{COCH}_3)-\text{CO}-$) の式量 170 と類似しており、場合によっては、多アセチル化体を主なピークと誤認し、脱アセチルがなされたものを、前記するアミノ酸の除去がなされたものとする懸念がある。実際には、式量差が 1 であるグルタミン残基とグルタミン酸残基との弁別が可能な分析精度の測定がなされ、上述する残留しているアセチル基数の差と、類似する式量を示すアミノ酸残基の間では、式量差が 2~3 であり、多くの場合、かかる誤認を生じる可能性は高くなない。これらを考慮に入れると、上記の後処理工程を実施し、不要なアルカノイル基の残留を排除することが、より好ましいものである。

10

実施例

以下に、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。なお、かかる実施例は、本発明にかかる最良の実施形態の一例ではあるものの、本発明はかかる具体例の形態により限定を受けるものではない。

15

(実施例 1)

本発明にかかるペプチドの C 末端アミノ酸配列解析方法の有効性を検証する目的で、153 アミノ酸からなるヘムタンパク質、ウマ由来のミオグロビンについて、そのタンパク質部分グロビン・ペプチド鎖の C 末端アミノ酸配列の解析を行った。

20

本実施例で利用する、解析対象試料となるウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖が有するアミノ酸配列は既に判明しており、本発明にかかる解析方法で特定される C 末端アミノ酸配列の特定精度を検証した。

(ゲル電気泳動法による単離)

25

先ず、市販されているウマ・ミオグロビン標品について、0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度でグロビン・ペプチド鎖部分のみを含有するペプチド溶液を調製する。なお、該、ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖部分には、ヒト・ミオグロビンと異なり、システイン残基は存在しないが、仮に、ヒト・ミオグロビンなどのよ

うに、システイン残基を内在するペプチドに対しては、該システイン残基のスルファニル基（-SH）の酸化による、-S-S-結合の形成を回避するため、2-スルファニルエタノール、DTTなどの還元性試薬を添加するなどして、予め酸化防止処理を施す。

5 このペプチド溶液をゲル濃度12.5質量%のポリアクリルアミド・ゲル上にスポットし、電気泳動処理後、クーマシー・染色により、目的とするグロビン・ペプチド鎖のバンドを特定する。本例では、かかる染色バンド部のゲルを切り出し、ゲル切片を以下の一連の操作に供する。

(ゲルの脱水処理)

10 ゲル切片を、気密性を有するチューブ中に入れ、アセトニトリル 1m1を注入し、15分間攪拌する。その後、前記アセトニトリルを棄て、新たに、アセトニトリル 1m1を注入し、更に15分間攪拌する。このアセトニトリルを利用する、ゲル中に含浸する水の抽出処理を、合計3回行い、ゲルの脱水処理を行う。脱水処理に伴い、ゲル体積の収縮が生じる。

15 (前処理操作)

次いで、チューブ中で、脱水処理済みのゲル切片に、10体積%濃度の無水酢酸のホルムアミド溶液 1m1を注入する。乾燥雰囲気下で、蜜栓したチューブを攪拌しつつ、該容器全体の温度を、50°Cに加熱し、かかる温度に、3時間保持する。

20 この加熱保持の間に、当初、体積収縮しているゲルは、溶媒ホルムアミドの浸潤に従って、再膨潤し、本来の体積に復する。この再膨潤したゲル中に担持されているグロビン・ペプチド鎖に対して、溶質の無水酢酸が、前記加熱温度で作用する結果、ペプチドのN末端アミノ基に選択的なアセチル化反応が進行する。加えて、ペプチド鎖内に含有される、リシン残基（-NH-CH(CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂)₂-CO-）のε位のアミノ基へのN-アセチル化、同時に、セリン残基（-NH-CH(CH₂OH)-CO-）やトレオニン残基（-NH-CH(CH(CH₃)OH)-CO-）に存在するヒドロキシ基に対するO-アセチル

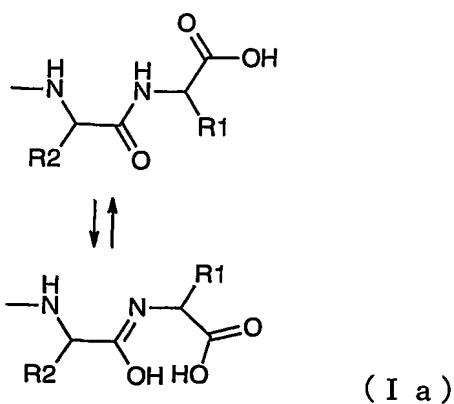
化、チロシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH})-\text{CO}-$) のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アセチル化がなされる。

上記のN末端アミノ基のN-アセチル化、ならびに、アミノ酸残基側鎖のN-アセチル化、O-アセチル化による保護を施した後、無水酢酸のホルムアミド溶液を除去し、チューブ容器中にアセトニトリル 1 m l を注入し、15分間攪拌する。その後、前記アセトニトリルを棄て、新たに、アセトニトリル 1 m l を注入し、更に15分間攪拌する。このアセトニトリルを利用する、ゲル中に含浸するホルムアミド溶液の抽出処理を、合計3回行い、再膨潤ゲル中の脱溶媒（ホルムアミド）処理を行う。脱溶媒処理に伴い、ゲル体積の収縮が生じ、同時に、
10 ゲルの脱水処理もなされる。

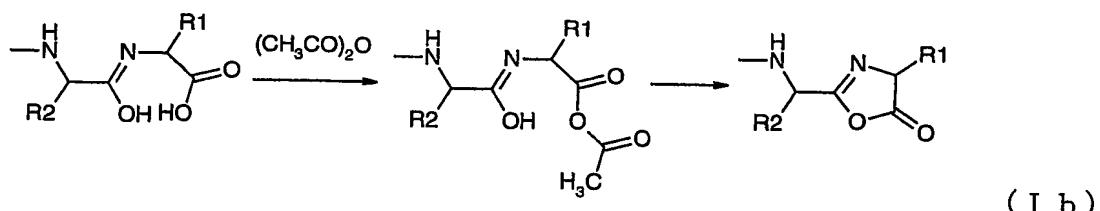
（C末端アミノ酸分解除去反応の操作）

次いで、得られるアセチル基による修飾・保護を施したグロビン・ペプチド鎖をゲル中に担持されている状態の、ゲル切片を入れた前記チューブ内に、ヘプタフルオロブタン酸 (H F B A : $\text{C}_3\text{F}_7\text{COOH}$) 1体積%、無水酢酸10体積%のホルムアミド溶液 1 m l を注入する。乾燥雰囲気下で、蜜栓した容器を攪拌しつつ、該容器全体の温度を、40°Cに加熱し、かかる温度に、16時間保持する。

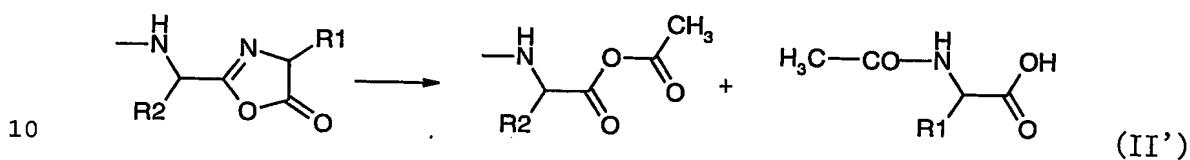
この加熱保持の間に、当初、体積収縮しているゲルは、溶媒ホルムアミドの浸潤に従って、再膨潤し、本来の体積に復する。この再膨潤したゲル中に担持されているペプチド鎖C末端に対して、H F B Aと無水酢酸とを前記加熱温度で作用させることで、ペプチド鎖のC末端アミノ酸の選択的分解反応が進行する。具体的には、ペプチドのC末端においては、プロトン・ドナーとして機能するH F B Aにより促進される、下記する反応式 (I a) :



で示されるケトーエノール互換異性化、ならびに、C末端のカルボキシ基に無水酢酸が作用し、例えば、下記する反応式 (I b) :



で示される、非対称型酸無水物への変換と環状エステル化が進行し、5-オキサゾロン構造へと一旦、変換される。更には、この5-オキサゾロン環から、例えば、反応式 (II') で表記される反応 :



等の反応を経て、C末端のアミノ酸の離脱と、次段の反応中間体の形成を進行して、逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解が進むと推断される。

このC末端アミノ酸の逐次的な分解反応が進行し、ゲル中には、段階的にC末端アミノ酸が除去された、一連の反応産物と、初段の5-オキサゾロン構造への変換時点に留まっている、アセチル基による修飾・保護を施した元のペプチド鎖とが含まれた混合物が、ゲル担体に担持された状態で残される。かかるC末端アミノ酸の逐次的分解処理を終えた後、容器内に残留する、未反応の無水酢酸やHFBBA等を含むホルムアミド溶液を除去し、容器中にアセトニトリル 1mL を

注入し、15分間攪拌する。その後、前記アセトニトリルを棄て、新たに、アセトニトリル 1m1を注入し、更に15分間攪拌する。このアセトニトリルを利用する、ゲル中に含浸するホルムアミド溶液の抽出処理を、合計3回行い、再膨潤ゲル中の脱溶媒（ホルムアミド）処理を行う。脱溶媒処理に伴い、ゲル体積の
5 収縮が生じ、同時に、ゲルの脱水処理もなされる。

（後処理操作）

次いで、反応産物が含まれる混合物が担持されている状態のゲル切片を入れた前記容器内に、DMAE ((CH₃)₂N-CH₂CH₂OH) 10体積%濃度の水溶液 1 m1を注入する。蜜栓した該容器を攪拌しつつ、容器全体の温度を、
10 60°Cに加熱し、かかる温度に、1時間保持する。その際、脱水処理されていたゲルは、溶媒水の浸潤に従って、速やかに再膨潤し、本来の体積に復する。この再膨潤したゲル中に担持されているペプチド鎖、反応産物に対して、塩基性窒素含有有機化合物の存在下、水分子を前記加熱温度で作用させることで、加水処理が進行する。

15 この後処理における加水処理は、主に、前記混合物中では、反応産物ペプチドのC末端は、カルボキシ基に変換されたもの以外に、5-オキサゾロン構造に留まつたもの、あるいは、非対称型酸無水物への変換まで進行したものも、含まれた混合物状態となっているため、これらに加水処理を施し、ペプチドのC末端は、カルボキシ基となった状態へと変換する処理である。加えて、塩基性窒素含有有機化合物が塩基触媒として機能することに伴い、アセチル基による修飾・保護を施したペプチド鎖上に、セリン残基 (-NH-CH(CH₂OH)-CO-) やトレオニン残基 (-NH-CH(CH(CH₃)OH)-CO-) に存在するヒドロキシ基に対するO-アセチル化保護は加水分解され、脱保護がなされ、また、チロシン残基 (-NH-CH(CH₂-C₆H₄-OH)-CO-) のフェノール性
20 ヒドロキシ基へのO-アセチル化保護の加水分解に部分的に進む。但し、用いる有機塩基の塩基性は高くないため、N-アセチル化保護の脱保護は進まず、最終的に後処理工程後には、より高い選択性を持って、N末端のアミノ基に対するN
25

—アセチル化、リシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-\text{CO}-$) の ϵ 位のアミノ基へのN—アセチル化、ならびに、場合によっては、チロシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH})-\text{CO}-$) のフェノール性ヒドロキシ基へのO—アセチル化のみが残るものとなる。

5 かかる後処理工程を終えた後、容器内に残留する水溶液を除去し、容器中にアセトニトリル 1 m l を注入し、15分間攪拌する。その後、前記アセトニトリルを棄て、新たに、アセトニトリル 1 m l を注入し、更に15分間攪拌する。このアセトニトリルを利用する、ゲル中に含浸する水溶液の抽出処理を、合計3回行い、再膨潤ゲル中の脱水処理を行う。脱水処理に伴い、ゲル体積の収縮が生じる。

10 (トリプシン消化によるペプチド断片化)

ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖は、153アミノ酸からなるため、質量分析における、適正な分子量範囲を逸脱しており、トリプシン消化によるペプチド断片化処理を行う。

15 具体的には、前記の後処理を施し、脱水処理済みのゲル切片を入れた容器内に、トリプシン含有水性溶液を加え、ゲル担体上に担持されている状態のまま、ペプチド鎖の断片化を行う。前記トリプシン含有水性溶液は、重炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8) 中に、トリプシンを $0.067 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度で含有しており、トリプシン消化は、37°Cで、攪拌しつつ、4時間酵素反応を行う。その際、20 脱水処理されていたゲルは、溶媒水の浸潤に従って、速やかに再膨潤し、本来の体積に復する。この再膨潤したゲル中に担持されているペプチド鎖、反応産物に対して、前記緩衝液とともに、ゲル中に浸入するトリプシンを前記加熱温度で作用させることで、トリプシンに特異的な酵素消化が進行する。

25 なお、ペプチド鎖、反応産物は、前記後処理工程における脱保護によっても、N末端のアミノ基に対するN—アセチル化、リシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-\text{CO}-$) の ϵ 位のアミノ基へのN—アセチル化は保持された状態であり、トリプシン消化によっては、前記N—アセチル化リシン残基

のC末側ペプチド結合の切断はなされず、アルギニン残基のC末側ペプチド結合切断のみが進行する。このウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖が有するアミノ酸配列は既に判明しており、図4に示す153アミノ酸からなる元のペプチド鎖は、1-31、32-139、140-153の各部分アミノ酸配列を含む断片に、トリプシン消化を受ける。従って、上述するC末端アミノ酸の逐次的分解処理で生成される一連の反応産物は、前記140-153アミノ酸の部分アミノ酸配列を含むC末断片とともに、各C末端アミノ酸に相当する分子量差を示す、一連の質量分析ピークを与える。なお、図4には、前処理操作に伴い、N-アセチル化保護が施されるリシン残基を網かけ表示で示し、さらには、トリプシン消化による、アルギニン残基のC末側ペプチド結合切断で生じる、1-31と140-153の各部分アミノ酸配列を太字で示す。

かかるトリプシン消化処理工程を終えた後、ゲル中から容器内のトリプシン溶液中に溶出する断片化されたペプチドを回収する。回収されたペプチド断片の混合物を含む溶液について、脱塩処理を施した後、凍結真空乾燥処理を行う。

15 (後処理、トリプシン消化によるペプチド断片化済みの反応産物の特定)

以上の一連の処理を施して得られる、後処理、ペプチド断片化済みの反応産物とグロビン・ペプチド鎖のC末断片との混合物について、質量分析法により、含有される各ペプチド断片の分子量の測定を行う。

本実施例では、上記乾燥処理を行ったペプチド断片混合物試料に対して、質量分析装置、具体的には、MALDI-TOF-MS装置を利用し、各ペプチド断片の分子量を反映する主イオン種ピークの質量と、その相対的な信号強度の測定、比較を行う。なお、かかるMALDI-TOF-MS装置を利用する測定では、イオン種の分別は、負帯電イオン種を検出器へ導く、所謂ネガティブ・モードの測定を採用している。

25 図2は、上述する本実施例の一連の処理法で、C末端アミノ酸の逐次的分解処理を施した反応産物のトリプシン消化断片を含む混合物について、測定された質量分析スペクトルを示す。表1に、測定されたピークの質量値、元のグロビン・

ペプチド鎖のC末端断片に起因するピークの質量値との差異、ならびに、それから特定される、各反応産物断片において除去されているアミノ酸、および、各反応産物の形態を示す。

表1

m/Z	Δ m	帰属	対応ペプチド構造
1636.55	—		<u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELGFQG</u>
1578.49	58.06	—Gly	<u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELGFQ</u>
1450.52	186.03	—Gln-Gly	<u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELGF</u>

5

元のグロビン・ペプチド鎖中、前記140-153アミノ酸からなるC末端断片の部分アミノ酸配列は、二つのリシン側鎖上のN-アセチル化されている、NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELGFQGであり、図1に示される一連のピークは、そのC末端から、二つのアミノ酸、グリシンとグルタミンが逐次的に分解されたものに相当することが確認される。すなわち、解析対象である上述のゲル切片上のバンドとして分離されるペプチド鎖は、実際に、グロビン・ペプチド鎖であることが、検証される。

(参考例1)

本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、一連の反応操作を解析対象のペプチド鎖をゲル電気泳動法による単離し、かかるゲル担体上に担持した状態で行っている点に最大の特徴を有するが、その解析確度は、予め、ペプチド鎖のみとした上で、C末端アミノ酸配列解析を進めた場合と、本質的に、何ら遜色の無いことを確認する目的で、ゲル担体上に担持されていない状態において、上述するウマ・ミオグロビンのタンパク質部分グロビン・ペプチド鎖のC末端アミノ酸配列解析を行った。

(単離、乾燥ペプチド粉末試料の調製)

先ず、市販されているウマ・ミオグロビン標品について、1.0 μ g/ μ Lの濃度でグロビン・ペプチド鎖部分のみを含有するペプチド溶液を調製する。前記

ペプチド溶液を試験管に採り、凍結乾燥して、乾燥ペプチド粉末試料を調製する。

(前処理操作)

次いで、この乾燥ペプチド試料を収納したバイアルを、テフロン製コックバルブ封止される真空排気用のポートを具えた、共栓付き気密試験管型のガラス製反応容器内に装着し、このガラス製反応容器内に別途、下記する液状試薬を所定量入れる。前処理用の試薬として、酢酸を5体積%添加した無水酢酸(300μL)を用い、前記ガラス製反応容器内に乾燥ペプチド試料を収納したバイアルを収納した後、冷却下、反応容器内を真空排気し、気密状態に封止する。

この気密状態の反応容器全体を、50°C、2時間保温して、容器内の液状試薬から供給される、蒸気状の無水酢酸と酢酸を、乾燥ペプチド試料に作用させる。

このアシル化試薬として、無水酢酸を酢酸共存下で、乾燥ペプチド試料に作用させることで、ペプチドのN末端アミノ基に選択的なアセチル化反応が進行する。加えて、ペプチド鎖内に含有される、リシン残基($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-\text{CO}-$)の ε 位のアミノ基へのN-アセチル化、同時に、セリン残基($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$)やトレオニン残基($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH})-\text{CO}-$)に存在するヒドロキシ基に対するO-アセチル化、チロシン残基($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH})-\text{CO}-$)のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アセチル化がなされる。

かかる前処理を終えた後、反応容器内に残留する、未反応の無水酢酸や酢酸等を減圧留去するとともに、得られる保護・修飾されたグロビン・ペプチド鎖の乾燥を行う。

(C末端アミノ酸分解除去反応の操作)

次いで、得られるアセチル基による修飾・保護を施したグロビン・ペプチド鎖を保持しているバイアルを、同じく共栓付き気密試験管型のガラス製反応容器内に装着した状態で、このガラス製反応容器内に別途、下記する液状試薬を所定量入れる。

このC末端アミノ酸の選択的分解反応用の液状試薬として、ヘプタフルオロブ

タン酸 (HFB A : C_3F_7COOH) を 1 体積% 添加した無水酢酸 (300 μL) を用い、前記ガラス製反応容器内に乾燥試料を収納したバイアルを収納した後、冷却下、反応容器内を真空排気し、気密状態に封止する。

この気密状態の反応容器全体を、40°C、3時間保温して、容器内の液状試薬から供給される、蒸気状の無水酢酸と HFB A を、乾燥ペプチド試料に作用させる。その間、ペプチド鎖 C 末端に対して、HFB A と無水酢酸とを前記加熱温度で作用させることで、上述する実施例 1 に記載する反応式 (I a) ~ (II') の反応経路を経て、ペプチド鎖の C 末端アミノ酸の逐次的分解反応が進行する。

かかる C 末端アミノ酸の選択的分解処理を終えた後、反応容器内に残留する、未反応の無水酢酸や HFB A 等を減圧留去するとともに、残余するアセチル化保護・修飾されたグロビン・ペプチド鎖と得られる反応産物との混合物の乾燥を行う。

(後処理操作)

次いで、反応産物が含まれる混合物の乾燥試料を保持しているバイアルを、同じく共栓付き気密試験管型のガラス製反応容器内に装着した状態で、このガラス製反応容器内に別途、下記する液状試薬を所定量入れる。

この後処理は、主に、前記混合物中では、反応産物ペプチドの C 末端は、カルボキシ基に変換されたもの以外に、5-オキサゾロン構造に留まったもの、あるいは、非対称型酸無水物への変換まで進行したものも、含まれた混合物状態となっているため、これらに加水処理を施し、ペプチドの C 末端は、カルボキシ基となつた状態へと変換する処理である。すなわち、後処理用の液状試薬として、DMAE を 10 体積% 溶解した水溶液 (300 μL) を用い、前記ガラス製反応容器内に乾燥試料を収納したバイアルを収納した後、冷却下、反応容器内を真空排気し、気密状態に封止する。

この気密状態の反応容器全体を、60°C、1時間加熱して、容器内の液状試薬から供給される、蒸気状の DMAE と水分子を、乾燥試料に作用させる。非対称型酸無水物ならびに 5-オキサゾロン構造は、有機塩基である DMAE の共存下、

水分子を作用することで、加水がなされ、C末端にカルボキシ基を有する形状に変換される。加えて、アセチル基による修飾・保護を施したペプチド鎖上に、セリン残基（-NH-CH（CH₂OH）-CO-）やトレオニン残基（-NH-CH（CH（CH₃）OH）-CO-）に存在するヒドロキシ基に対するO-アセチル化保護は加水分解され、脱保護がなされ、また、チロシン残基（-NH-CH（CH₂-C₆H₄-OH）-CO-）のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アセチル化保護の加水分解に部分的に進む。但し、用いる有機塩基の塩基性は高くないため、N-アセチル化保護の脱保護は進まず、最終的に後処理工程後には、より高い選択性を持って、N末端のアミノ基に対するN-アセチル化、リシン残基（-NH-CH（CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂）-CO-）のε位のアミノ基へのN-アセチル化、ならびに、場合によっては、チロシン残基（-NH-CH（CH₂-C₆H₄-OH）-CO-）のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アセチル化のみが残るものとなる。

かかる後処理を終えた後、反応容器内に残留する、残余している水分子やDMAE等を減圧留去するとともに、後処理済み反応産物の混合物の乾燥を行う。

（トリプシン消化によるペプチド断片化）

ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖は、153アミノ酸からなるため、質量分析における、適正な分子量範囲を逸脱しており、トリプシン消化によるペプチド断片化処理を行う。

具体的には、前記後処理済み反応産物の混合物を乾燥した試料を容器内に入れ、トリプシン含有水性溶液を加え、ペプチド鎖の断片化を行う。前記トリプシン含有水性溶液は、3-ピリジン酢酸緩衝液（pH 7）中に、トリプシンを0.1 μg/μLの濃度で含有しており、トリプシン消化は、37°Cで、攪拌しつつ、8時間酵素反応を行う。

なお、ペプチド鎖、反応産物は、前記後処理工程における脱保護によっても、N末端のアミノ基に対するN-アセチル化、リシン残基（-NH-CH（CH₂

CH₂CH₂CH₂NH₂) -CO-) のε位のアミノ基へのN-アセチル化は保持された状態であり、トリプシン消化によっては、前記N-アセチル化リシン残基のC末端ペプチド結合の切断はなされず、アルギニン残基のC末端ペプチド結合切断のみが進行する。このグロビン・ペプチド鎖が有するアミノ酸配列は既に判明しており、153アミノ酸からなる元のペプチド鎖は、1-31、32-139、140-153の各部分アミノ酸配列を含む断片に、トリプシン消化を受ける。従って、上述するC末端アミノ酸の逐次的分解処理で生成される一連の反応産物は、前記140-153アミノ酸の部分アミノ酸配列を含むC末端断片とともに、各C末端アミノ酸に相当する分子量差を示す、一連の質量分析ピークを与える。

トリプシン消化後、反応液は、Z₁pT₁pを利用して、脱塩処理、ならびに、ペプチド断片の分離・回収を行った後、これらペプチド断片の真空乾燥を行う。

(後処理、トリプシン消化によるペプチド断片化済みの反応産物の特定)

以上の一連の処理を施して得られる、後処理、ペプチド断片化済みの反応産物とグロビン・ペプチド鎖のC末端断片との混合物について、質量分析法により、含有される各ペプチド断片の分子量の測定を行う。

本参考例では、乾燥したペプチド断片混合物試料に対して、質量分析装置、具体的には、MALDI-TOF-MS装置を利用し、各ペプチド断片の分子量を反映する主イオン種ピークの質量と、その相対的な信号強度の測定、比較を行う。なお、かかるMALDI-TOF-MS装置を利用する測定では、イオン種の分別は、負帯電イオン種を検出器へ導く、所謂ネガティブ・モードの測定を採用している。

図3は、上述する本参考例の一連の処理法で、C末端アミノ酸の逐次的分解処理を施した反応産物のトリプシン消化断片を含む混合物について、測定された質量分析スペクトルを示す。表2に、測定されたピークの質量値、元のグロビン・ペプチド鎖のC末端断片に起因するピークの質量値との差異、ならびに、それから特定される、各反応産物断片において除去されているアミノ酸、および、各反応

産物の形態を示す。

表 2

m/Z	Δ m	帰属	対応ペプチド構造
1636.58	—		<u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELGFQG</u>
1578.55	58.03	—Gly	<u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELGFQ</u>
1449.58	187.00	—Gln-Gly	<u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELGF</u>
1302.58	334.00	—Phe-Gln-Gly	<u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELG</u>
1245.74	390.84	—Gly-Phe-Gln-Gly	<u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) EL</u>

本参考例の蒸気状の試薬を利用する処理法では、C末端アミノ酸の逐次的分解
5 処理により、C末端から4アミノ酸；グリシン、グルタミン、フェニルアラニン、
グリシンの除去された一連の反応産物が得られている。また、前記140-15
3アミノ酸の部分アミノ酸配列を含むC末端ペプチド断片等のピーク以外に、ト
リプシン消化により派生するペプチド断片、1-31アミノ酸部分、78-10
2アミノ酸部分に相当する、二つのピーク（分子量：2996, 18, 3485,
10 48）も観測されている。なお、前記78-102アミノ酸部分に相当する断片
は、N-アセチル化保護のうち、その一部が加水処理に際して、脱保護され、そ
の結果、トリプシン消化によって副生したものである。

なお、表1と表2に示す、C末端アミノ酸の逐次的分解処理に起因する一連の
15 ピークは、良い対応を示しており、本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配
列解析方法において、解析対象のペプチド鎖をゲル中に担持した状態で、C末端
アミノ酸の逐次的分解を進めた際にも、本質的に遜色のない解析確度が達成され
ていることが確認される。

産業上の利用の可能性

20 本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、ペプチドのC末端
アミノ酸を逐次的に分解除去する手段として、対象とするペプチドを、予めゲル

電気泳動法による分離を行った後、該ゲル担体上に担持された状態のままで、極性非プロトン性溶媒を用いてゲル担体の脱水処理を行った後、脱水処理によって收縮したゲル担体を、そのゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、ペーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液中に浸漬することにより、30°C～80°Cの範囲に選択される温度において、ゲル担体の再膨潤を行うとともに、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物とペーフルオロアルカン酸とを作用させ、5-オキサゾロン構造を経て、該5-オキサゾロン環の開裂に伴いC末端アミノ酸の分解を行って、一連の反応産物を調製する手法を採用している。かかる手法では、利用するアルカン酸無水物自体、反応性が低いため、ペプチドの途中におけるペプチド結合の分断等の不要な副次反応を引き起こすことなく、ペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解除去することが可能となる。さらには、かかる穏和な条件での反応を利用することで、得られる一連の反応産物において達成される、短縮されるC末端アミノ酸配列の最大アミノ酸長の調節、制御性もより優れたものとできる。従って、このペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解除去する際の優れた制御性、ならびに、穏和な反応条件、例えば、反応温度の許容される変動幅の広さの利点に加えて、予めゲル電気泳動法による分離を行った後、ゲル担体上に担持された状態のままで解析を行うため、ゲル担体上から分離・回収する煩雑な工程を省き、また、分離・回収時の低い収率による試料損失を回避できるという実用上の利点を具えており、本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、より汎用性に富む解析方法となる。

請求の範囲

1. 解析対象とするペプチドのC末端アミノ酸配列を解析する方法であって、
対象とするペプチドより、化学的手段によりC末端アミノ酸を逐次的に分解し
て得られる一連の反応生成物を含む混合物を調製する工程と、

5 前記一連の反応生成物と、元となるペプチドとの分子量差を、質量分析法によ
り分析し、かかるC末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程
と、

測定された一連の分子量減少量に基づき、逐次的分解された一連のアミノ酸を
特定し、C末端より配列させて、C末端のアミノ酸配列情報を得る工程とを具え、

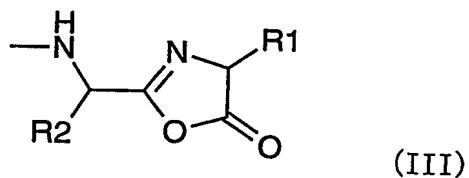
10 前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程は、

予めゲル電気泳動法による分離がなされ、該ゲル担体上に担持された状態の対
象とするペプチド試料に対して、

前記ゲル担体中に含浸される水溶媒を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、か
つ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去するこ
とにより、該ゲル担体の脱水処理を行う工程と、

15 前記脱水処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチ
ド試料に対して、30°C~80°Cの範囲に選択される温度において、
該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶
媒中に、パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で
20 溶解してなる混合溶液を用いて、該混合溶液中に該ゲル担体を浸漬することによ
り、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物とパーフルオ
ロアルカン酸とを作用させ、

ペプチドのC末端において、下記する一般式 (III) :



(式中、

R 1 は、ペプチドの C 末端アミノ酸の側鎖を表し、

R 2 は、前記 C 末端アミノ酸の直前に位置するアミノ酸残基の側鎖を表す) で表記される 5-オキサゾロン構造を経て、該 5-オキサゾロン環の開裂に伴い C 末端アミノ酸の逐次的分解を行う工程と、

5 前記 C 末端アミノ酸の逐次的分解反応に利用した混合溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、前記パーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釀除去することにより、分解反応の停止と反応試薬の除去を行う工程とを有する、対象とするペプチド試料を該ゲル担体上に担持された状態で処理する方法によりなされ、

該ゲル担体上に担持された状態のまま、前記の C 末端アミノ酸を逐次的に分解する処理を施して、得られる一連の反応生成物ならびに元となるペプチドとを含む混合物を、前記質量分析工程に供することを特徴とするペプチドの C 末端アミノ酸配列解析方法。

15 2. 前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるアルカン酸無水物として、炭素数 2 ~ 4 のアルカン酸の対称型酸無水物を用いることを特徴とする、請求の範囲 第 1 項に記載の方法。

3. 前記炭素数 2 ~ 4 のアルカン酸の対称型酸無水物として、炭素数 2 ~ 4 の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物を用いることを特徴とする、請求の範囲 第 2 項に記載の方法。

4. 前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるアルカン酸無水物として、無水酢酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第 1 項に記載の方法。

25 5. 前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるパーフルオロアルカン酸として、当該パーフルオロアルカン酸の示す pK_a は、0.3 ~ 2.5 の範囲であるパーフルオロア

ルカン酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

6. 前記ペーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるペーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4のペーフルオロアルカン酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

7. 前記炭素数2～4のペーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4の直鎖ペーフルオロアルカン酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第6項に記載の方法。

8. 前記ペーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液中における、アルカン酸無水物とペーフルオロアルカン酸との含有比率は、アルカン酸無水物100容当たり、ペーフルオロアルカン酸1～20容の範囲に選択することを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

9. 前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中の反応処理に際して、前記反応系は、水分に加えて、酸素も除去された乾燥雰囲気下に保たれることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

10. 前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程では、前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中の反応処理後、極性非プロトン性溶媒を用いて、該混合溶液を希釈除去することにより、分解反応の停止と反応試薬の除去を行う工程を終えた後、

さらに、前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する反応で得られる一連の反応生成物を含む混合物に対して、該ゲル担体上に担持された状態のまま、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を溶解する水溶液を利用し、該水溶液中にゲル担体を浸漬することにより、前記塩基性の窒素含有有機化合物の共存下、前記反応生成物ペプチドに水分子を作用させ、加水処理を施し、

次いで、前記ゲル担体中に含浸される水溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈

除去することにより、該ゲル担体の再脱水処理を施すことからなる、付加的な加水処理と再脱水処理の工程を設けることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

1 1. 前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程では、

5 前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中の反応処理に先立ち、

前記脱水処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、30°C～80°Cの範囲に選択される温度において、

10 該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、アルカン酸無水物を溶解してなる溶液を用いて、該アルカン酸無水物溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物を作用させ、対象とするペプチドのN末端のアミノ基に、予め、前記アルカン酸無水物を構成するアルカン酸に由来するアシル基によるN—アシル化保護を施し、

15 次いで、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、前記アルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、N—アシル化反応の停止と反応試薬の除去を行う前処理工程を設けることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

1 2. 該N末端に対するN—アシル化保護を施す前処理工程で利用する前記アルカン酸無水物と、その後に実施する前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程で利用する前記アルカン酸無水物とに、同じアルカン酸無水物を用いることを特徴とする、請求の範囲 第11項に記載の方法。

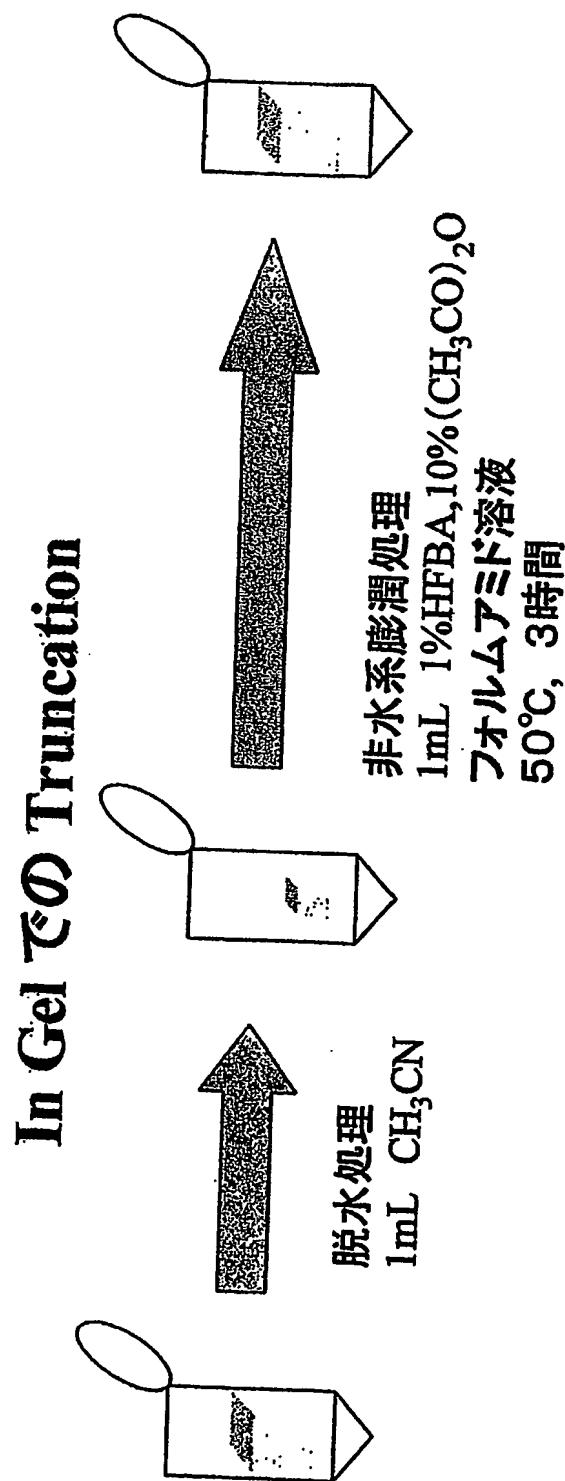
1 3. 予めゲル電気泳動法による分離がなされ、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料の調製は、

25 該ゲル担体として、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる電気泳動法を利用してなされることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

1 4. 前記一連の反応生成物と、元となるペプチドとを、質量分析法により分析する工程において、該質量分析法として、MALDI-TOF型質量分析法を

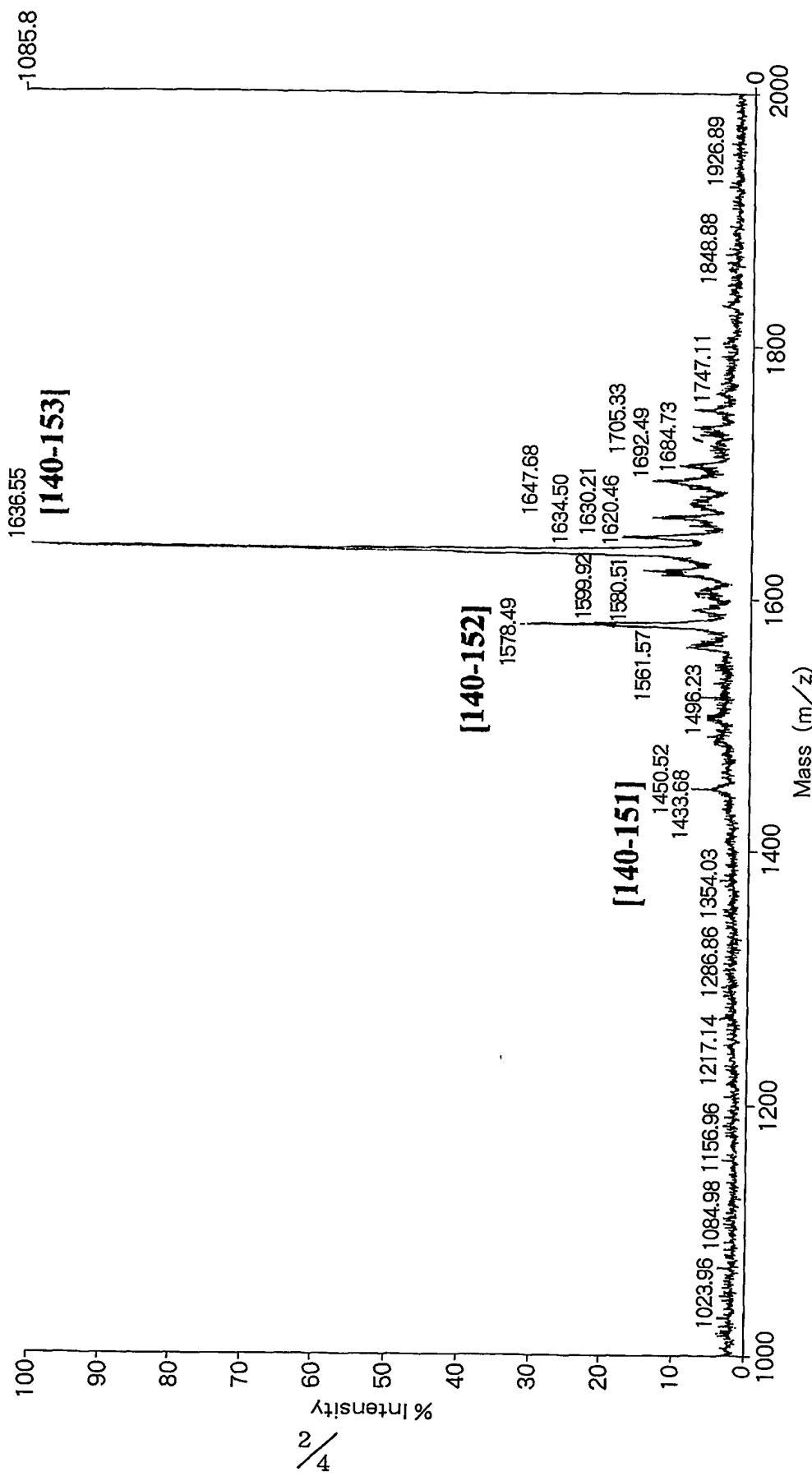
選択することを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

Fig. 1



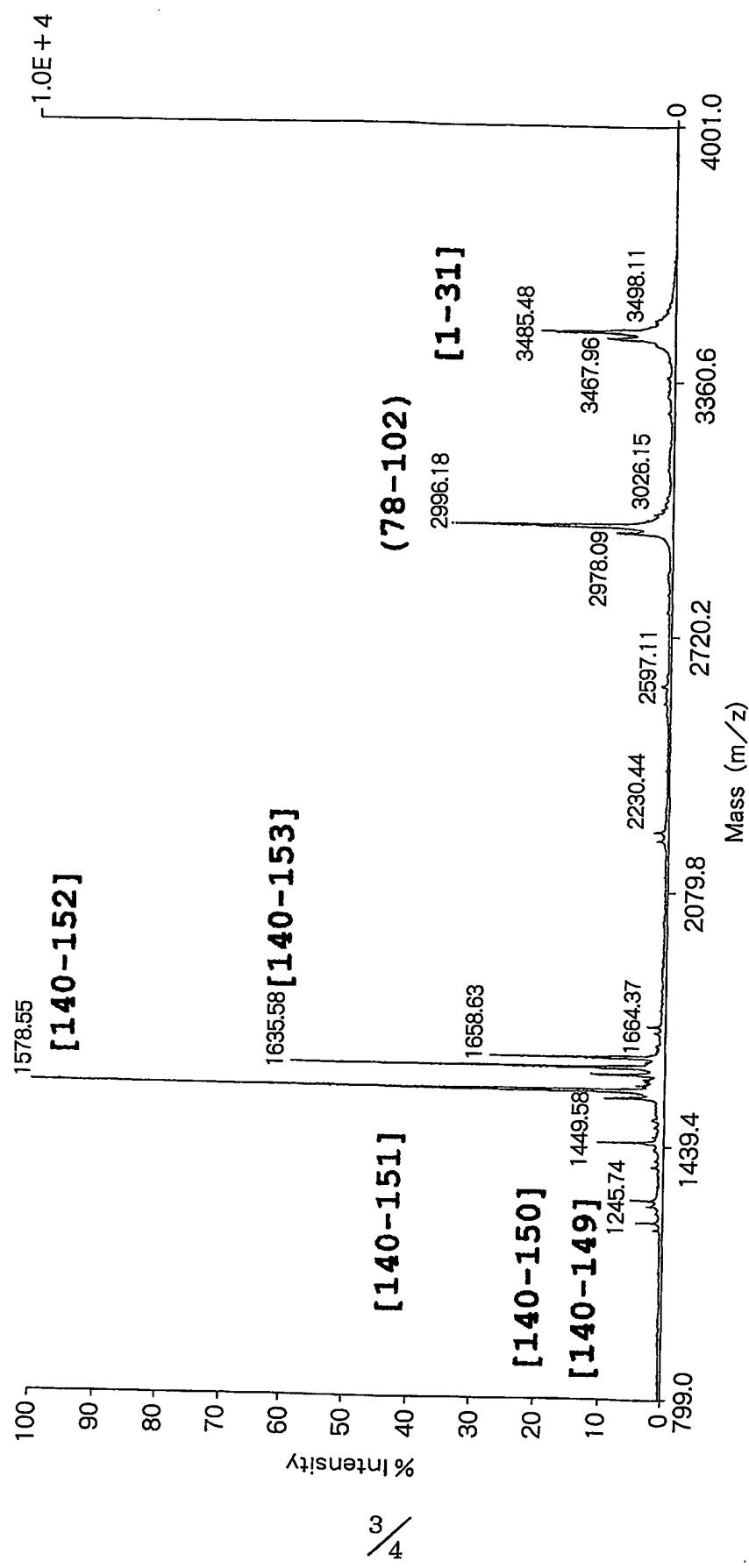
Mb truncation reaction in gel

Fig. 2



Mb, 3h in test tube

Fig. 3



注) (78-102) はアセチル化不十分のためリジンの位置でトリプシン消化された断片と考えられる。

Fig. 4

myoglobin - horse

[1 - 153] mass = 17738.180
Cleavage at R

Small polar : D(7) E(13) N(3) Q(6)
Large polar : K(19) R(2) H(11)
Small non-polar : S(5) T(7) A(15) G(15)
Large non-polar : L(17) I(9) V(7) M(2) F(7) Y(2) W(2)
Special : C(0) P(4)

K[16] + 42.04 K[42] + 42.04 K[45] + 42.04 K[47] + 42.04
K[50] + 42.04 K[56] + 42.04 K[62] + 42.04 K[63] + 42.04
K[77] + 42.04 K[78] + 42.04 K[79] + 42.04 K[87] + 42.04
K[96] + 42.04 K[98] + 42.04 K[102] + 42.04 K[118] + 42.04
K[133] + 42.04 K[145] + 42.04 K[147] + 42.04

1 G L S D G E W Q Q V L N V W G V E A D I A G H G Q E V L I 30
31 R I f t g h p e t l e f d f h l t e a e m k a s e d 60
61 I h g t v v l t a l g g i l g h h e a e l p l a 90
91 q s h a t h i p i y l e f i s d a i i h v l h s h p 120
121 g n f g a d a q g a m t a l e l f r N D I A A Y E L G 150
151 F Q G 153

(1) [1-31] = 3444.742 (2) [32-139] = 12692.649 (3) [140-153] = 1636.809

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/68, G01N27/447, G01N27/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/68, G01N27/447, G01N27/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-189029 A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 05 July, 2002 (05.07.02), (Family: none)	1-14
Y	JP 10-293130 A (Seiko Instruments Inc.), 04 November, 1998 (04.11.98), & US 6046053 A	1-14
A	JP 6-27113 A (Seiko Instruments Inc.), 04 February, 1994 (04.02.94), (Family: none)	1-14
A	JP 2000-146983 A (CITY OF HOPE), 26 May, 2000 (26.05.00), & WO 92/03737 A & AU 9182132 A & EP 495939 A & DE 69123345 E	1-14

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* "A" Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 December, 2003 (25.12.03)Date of mailing of the international search report
20 January, 2004 (20.01.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15270

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, A	JP 2003-279581 A (NEC Corp.), 02 October, 2003 (02.10.03), (Family: none)	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N 33/68 G01N 27/447 G01N 27/62

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N 33/68 G01N 27/447 G01N 27/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-189029 A(住友化学工業株式会社)2002.07.05 (ファミリー無し)	1-14
Y	JP 10-293130 A(セイコーインスツルメンツ株式会社)1998.11.04 & US 6046053 A	1-14
A	JP 6-27113 A(セイコー電子工業株式会社)1994.02.04 (ファミリー無し)	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.12.03

国際調査報告の発送日

20.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

官澤 浩

2 J 9407



電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	JP 2000-146983 A(シティ・オブ・ホープ)2000.05.26 & WO 92/03737 A & AU 9182132 A & EP 495939 A & DE 69123345 E	1-14
E, A	JP 2003-279581 A(日本電気株式会社)2003.10.02 (ファミリー無し)	1-14